

SÉRIE A, N° 2798

N° D'ORDRE : 3670

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

NICOLE BENHAMOU

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COUCHES MONO-
MOLECULAIRES DE PROTEINES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 1^{er} mars 1955 devant la Commission d'Examen :

MM. E. BAUER,	<i>Président.</i>
R. WURMSER	} <i>Examineurs.</i>
CL. FROMAGEOT.	

CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

9, RUE FULBERT, 9

—
1956

SÉRIE A, N° 2798

N° D'ORDRE : 3670

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

NICOLE BENHAMOU

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COUCHES MONO-
MOLÉCULAIRES DE PROTEINES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 1^{er} mars 1955 devant la Commission d'Examen :

MM. E. BAUER,	} <i>Président.</i>	
R. WURMSER		} <i>Examineurs.</i>
Cl. FROMAGEOT.		

CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

9, RUE FULBERT, 9

—
1956

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. J. PÈRES.

PROFESSEURS

G. JULIA.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	JANET.....	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
E. DARMOIS.....	T	Enseignement de Physique.	PETIT.....	T	Biologie maritime.
R. LEVY.....	T	Physiologie comparée.	QUENEY.....	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
FOCH.....	T	Mécanique physique et Exper.	GALLIEN.....	T	Embryologie.
PAUTHENIER.....	T	Électrotechnique générale.	EICHORN.....	T	Biologie Végétale (P.C.B.).
DE BROGLIE.....	T	Théories physiques.	DE CUGNAC.....		Biologie Végétale (P.C.B.).
JOB.....	T	Chimie générale.	M ^{lle} CAUCHOIS....	T	Chimie-Physique.
PRENANT.....	T	Anatomie et Histologie comparées.	THELLIER.....	T	Physique du globe.
GARNIER.....	T	Géométrie supérieure.	AUDUBERT.....	T	Électrochimie.
PERES.....	T	Mécanique des fluides et applications.	L'HÉRITIER.....	T	Génétique.
LAUGIER.....	T	Physiologie générale.	GRIVET.....	T	Radioélectricité.
M. CURIE.....	T	Physique (P.C.B.).	PONCIN.....	T	Mécanique des fluides.
BARRABÉ.....	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	THIRY.....	T	Mécanique appliquée.
G. DARMOIS.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématiques.	DUBREIL.....	T	Arithmétique et théorie des nombres.
J. BOURCART.....	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	QUELET.....	T	Chimie organique.
M ^{me} JOLIOT-CURIE..	T	Physique nucléaire et Radioactivité.	CAGNIARD.....	T	Géophysique appliquée.
PLANTEFOL.....	T	Botanique.	CHAMPETIER.....	T	Chimie macromoléculaire.
CABANNES.....	T	Recherches physiques.	CUVILLIER.....	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
GRASSÉ.....	T	Évolution des êtres organisés.	JUNG.....	T	Pétrographie.
PRÉVOST.....	T	Chimie organique.	TRILLAR.....	T	Chimie physique.
BOULIGAND.....	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	WIEMANN.....	T	Chimie (M.P.C.).
CHAUDRON.....	T	Chimie appliquée.	JACQUINOT.....	T	Spectroscopie et Physique céleste.
WYART.....	T	Minéralogie.	VASSY.....		Physique de l'atmosphère.
TEISSIER.....	T	Zoologie.	DESTOUCHES.....		Théories physiques.
MANGENOT.....	T	Biologie végétale.	M. PRUVOST.....	T	Géologie.
P. AUGER.....	T	Physique quantique et Relativité.	AMIEL.....	T	Chimie (P.C.B.).
MONNIER.....	T	Physiologie des fonctions.	HOCART.....	T	Minéralogie.
PIVETEAU.....	T	Géologie.	J.-P. MATHIEU....	T	Physique (P.C.B.).
ROCARD.....	T	Physique (E.N.S.).	COUTEAUX.....		Biologie animale (P.C.B.).
H. CARTAN.....	T	Mathématiques (E.N.S.)	MAY.....		Biologie animale (P.C.B.).
LAFFITTE.....	T	Chimie générale.	CHOQUET.....	T	Calcul différentiel et intégral.
FAVARD.....	T	Mécanique générale.	FELDMANN.....		Biologie (P.C.B.).
COULOMB.....	T	Physique du globe.	GUINIER.....	T	Physique (P.C.B.).
M ^{lle} COUSIN.....	T	Biologie animale (P.C.B.).	JOST.....	T	Biologie (P.C.B.).
CHRÉTIEN.....	T	Chimie minérale.	FORTET.....		Calcul des probabilités.
P. DRACH.....	T	Zoologie.	SCHWARTZ.....	T	Méth. Mathématique de la physique.
KASTLER.....	T	Physique.	CHOUARD.....	T	Physiologie végétale.
EPHROSSI.....	T	Génétique.	MALAVARD.....	T	Aviation.
WURMSER.....	T	Biologie physico-chimique.	BRELOT.....	T	Calcul différentiel.
RIVIERE.....	T	Géologie (S.P.C.N.).	NORMANT.....	T	Chimie (P.C.B.).
GAUTHERET.....	T	Biologie Végétale (P.C.B.).	BÉNARD.....		Chimie (P.C.B.).
LUCAS.....	T	Physique.	BUVAT.....		Botanique (E.N.S.).
A. THOMAS.....	T	Biologie cellulaire.	DUGUÉ.....		Statistiques mathématiques.
ARNULF.....	T	Optique appliquée.	GELOSO.....		Chimie (S.P.C.N.).
M. MORAND.....		Physique.	SOULAIRAC.....		Psychophysiologie.
SOLEILLET.....	T	Physique.	ULRICH.....		Physiologie végétale.
FORTIER.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.	MARÉCHAL.....		Optique théorique et appliquée.
DANJON.....	T	Astronomie.	KIRRMANN.....	T	Théories chimiques.
FROMAGEOT.....	T	Chimie Biologique.	CHADEFAUD.....		Botanique.
LAPORTE.....	T	Physique générale et Radioactivité.	DESTRIAU.....		Physique (M.C.P.).
			M ^{lle} Le BRETON....		Physiologie générale.
			SALEM.....		Mathématiques générales.

Secrétaire général..... Ch. MONIER.



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COUCHES MONOMOLÉCULAIRES DE PROTÉINES

I. — Propriétés des couches monomoléculaires d'oxyhémoglobine et de gliadine. Influence du pH du support.

INTRODUCTION

DEVAUX ⁽²⁴⁾, dès 1903, avait constaté en étalant de l'ovalbumine sur de l'eau, que les protéines, tout comme les corps gras à longue chaîne, pouvaient former des couches superficielles. Mais ce n'est qu'après l'obtention plus récente de couches protéiques réellement monomoléculaires et stables dans le temps que la technique superficielle est devenue une méthode d'investigation. Les couches superficielles protéiques peuvent, en effet, apporter des renseignements sur la structure des protéines et sur leur comportement.

Il existe deux sortes de couches superficielles: les *couches d'adsorption* qui se forment spontanément à la surface de solutions de protéines, et les *couches d'étalement* qui sont créées artificiellement par étalement de la protéine, à une interface eau-air, par exemple.

Le présent travail est consacré principalement à l'étude des couches d'étalement.

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS. — HISTORIQUE.

Lorsqu'une protéine passe d'un état tridimensionnel (solution, parcelle ou cristal) à l'état de

couche superficielle, elle subit probablement une transformation. L'insolubilité du film protéique, alors que la protéine est généralement soluble dans le support sur lequel on l'étaie, pourrait être, selon une opinion largement répandue, la conséquence de ce changement.

Pour l'instant on se bornera à constater ce fait expérimental appelé souvent « dénaturation superficielle ». Diverses interprétations ont essayé d'en rendre compte et l'attribuent soit à une mise à jour des groupes hydrophobes ordinairement dissimulés dans la molécule par les groupes hydrophiles [LANGMUIR ⁽⁴⁴⁾], soit à un déroulement en surface des chaînes peptidiques repliées dans la molécule aboutissant à la formation d'une structure β -kératine [ASTBURY, BELL et al. ⁽⁸⁾] avec répartition des groupes [hydrophobes vers l'air et des groupes hydrophiles vers l'eau [BULL ⁽¹²⁾, NEURATH ⁽⁴⁹⁾], soit encore à un dédoublement des couches de chaînes peptidiques préexistant en feuillets parallèles dans la molécule [DERVICHIAN ⁽²²⁾]. Il se pourrait du reste que la formation de films protéiques insolubles soit due, non pas à une dénaturation, mais simplement à une faible possibilité de désorption des molécules du film.

Les premiers travaux systématiques sur les couches monomoléculaires de protéines furent ceux de GORTER et GRENDL ⁽²⁸⁾ qui étudièrent les films de nombreuses protéines sur des supports à différents pH ⁽²⁷⁾, mais ces travaux sont certainement entachés d'erreurs par suite d'un mauvais étalement de la protéine.

Parmi les autres travaux, bornons nous à citer ceux de HUGHES et RIDEAL ⁽³⁸⁾ sur la gliadine, de MITCHELL ⁽⁴⁷⁾, de JONXIS ⁽⁴¹⁾ sur différentes espèces

d'hémoglobine, de PHILIPPI (53) qui montra l'importance des couches monomoléculaires protéiques dans l'étude des propriétés des protéines.

C'est grâce aux recherches de DERVICHIAN (21), JOLY (40) et GUASTALLA (34) que furent réalisés des films stables se prêtant à des mesures reproductibles. GUASTALLA (34) puis BULL (14) purent alors tirer de l'étude des courbes de compression des renseignements sur différentes constantes physico-chimiques de la molécule.

GUASTALLA (34, 36) eut le premier l'idée de déterminer par la manométrie superficielle les masses moléculaires des protéines étalées, bientôt suivi par BULL (13, 15) qui appliqua la méthode à de nombreuses protéines, et par POURADIER (56). Ce dernier a constaté le bon accord des valeurs trouvées par la méthode superficielle (55) pour les masses moléculaires de gélatines avec les résultats obtenus par osmométrie (2).

Parmi les travaux français sur les films protéiques, signalons ceux de GOUGEROT (29) qui a notamment étudié le comportement superficiel de solutions plus ou moins acides d'oxyhémoglobine.

Enfin, tout récemment, et parallèlement aux expériences qui vont être exposées ici, les résultats d'IMAHORI (39) au Japon sur la sérumalbumine et l'hémoglobine, de FRÉDÉRICQ (26) en Belgique sur l'insuline, disent tout l'intérêt que peut apporter à la connaissance de ces protéines l'étude de leurs couches monomoléculaires.

CHAPITRE II

APPAREILLAGE. — FORMATION DES COUCHES MONOMOLÉCULAIRES PROTÉIQUES ET PRÉCAUTIONS. — RÉSULTATS CLASSIQUES SUR LES ISOTHERMES DE FILMS PROTÉIQUES.

Les couches superficielles exercent une poussée à deux dimensions ou *pression superficielle* qui est la différence entre la tension superficielle de l'eau et celle de l'eau recouverte du film.

Appareillage.

Deux types d'appareils ont été utilisés pour la mesure des pressions à deux dimensions :

TENSIOMÈTRE.

Pour l'étude des couches d'adsorption, on a utilisé le tensiomètre de DOGNON-ABRIBAT (1) à lame plongeante, basé sur la méthode de WILHELMY (63). La force / avec laquelle la lame mouillable est happée est égale au produit de la tension superficielle par le périmètre de la lame.

MANOMÈTRE.

Dans le cas de couches d'étalement on emploie des manomètres dont le principe est dû à LANGMUIR (44) : la surface d'un liquide placé dans une cuve est séparée en deux compartiments par une barrière mobile. Après nettoyage des deux compartiments on étale le film à la surface de l'un des deux. La pression superficielle tend à déplacer la barrière.

Pour mesurer les pressions superficielles des couches protéiques on a utilisé deux manomètres superficiels à lecture directe dus à GUASTALLA.

1° *Manomètre à suspension pendulaire* (33, 35). — La poussée du film déplace une bandelette flottante qu'une pièce pendulaire tend à ramener à sa position initiale. L'appareil sert à mesurer des pressions superficielles allant de quelques centièmes de dynes/cm à 20 ou 30 dynes/cm.

Un piston permet de comprimer le film.

2° *Micromanomètre à fil tendu* (32, 35). — La poussée du film tend à incurver en arc de cercle un fil de soie enduit de vaseline, flottant sur l'eau et tendu avec une force connue.

Cet appareil est sensible à 0,001 dyne/cm.

On ne comprime pas les films étalés. On opère en faisant varier les quantités de substance étalée et on peut tracer directement la courbe pressions superficielles-concentrations superficielles.

On peut aussi se servir d'un dispositif spécial d'injection à deux dimensions dans le compartiment d'expérience : la *seringue superficielle* (35). Cette technique ne nécessite pas de solutions titrées ; on peut étaler directement le film à partir d'une parcelle solide.

Dans toutes ces mesures le *nettoyage des surfaces* (à l'aide de talc calciné) (31, 37) est essentiel.

Les *solutions* de protéines sont toujours faites dans de l'eau tridistillée et la verrerie utilisée doit être très propre.

Les *tampons* servant de support sont parfois « moussés » afin d'éliminer les impuretés tensioactives.

Formation des couches monomoléculaires protéiques.

La formation des couches superficielles peut se faire soit à partir de *parcelles* de protéines dont le poids est déterminé à l'aide d'une microbalance spéciale (38), soit à partir de *solutions* titrées (28), à l'aide d'une micropipette calibrée.

Différentes précautions sont à prendre pour que la couche soit monomoléculaire et pour éviter les pertes de protéine dans le support, si fréquentes dans les mesures des premiers expérimentateurs.

Il faut, notamment, disposer d'une *aire suffisante* pour permettre aux molécules de s'étaler et pour éviter la formation de films B instables et probable-

ment polymoléculaires [JOLY (40) et GUASTALLA (36)]. Le film après étalement doit être dans son état gazeux (36).

Les solutions employées doivent être suffisamment diluées (concentrations inférieures ou égales à 1 g/l) pour que les résultats soient quantitatifs et reproductibles. Par ailleurs, il est bon d'incorporer à la solution à étaler une trace d'alcool amylique (21) qui, en abaissant sa tension superficielle, favorise son étalement. La goutte de solution est laminée et la protéine s'adsorbe immédiatement en surface.

Isothermes des films protéiques. — Résultats classiques (36, 37).

On peut alors tracer à la température du laboratoire les courbes de compression. Un bon mode de représentation est le système pressions (dynes/cm) — concentrations superficielles (mg/m²) (fig. 1).

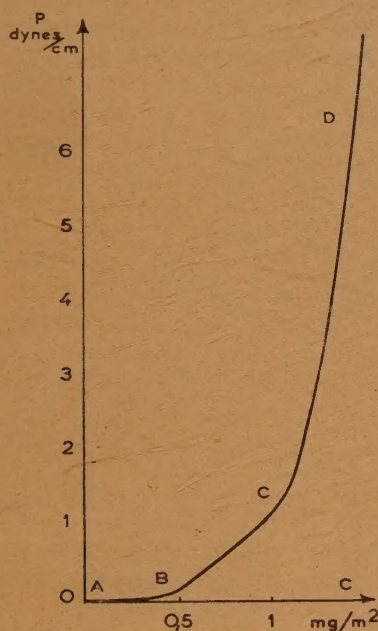


Fig. 1. — Ovalbumine sur HCL 0,01 N (20° C).

GUASTALLA a montré que l'on peut généralement distinguer sur la courbe $p-C$ trois portions :

1° AB représente un état gazeux.

2° BC, tronçon intermédiaire, correspond sans doute à la déformation des molécules protéiques déjà en contact les unes avec les autres. Il est remarquable par ses changements d'inclinaison avec le pH du support. Ses variations paraissent refléter des modifications chimiques des groupes polaires.

3° CD, courbe des hautes pressions, correspond à un état très compact du film (parfois gel à deux dimensions).

Détermination des masses moléculaires (34, 36, 37).

La loi des pressions du film gazeux, à la limite des dilutions superficielles, est $pS = RT$ pour une molécule-gramme. Cette loi est bien vérifiée, aux dilutions extrêmes, pour les films de corps parfaitement connus comme ceux de certains acides gras à longue chaîne.

Pour les protéines, on constate en général que la courbe pressions-concentrations dans le domaine gazeux, qui serait une droite passant par l'origine si le gaz superficiel était parfait, est en fait légèrement concave vers le haut. L'introduction de la cosurface b rend bien compte des faits. On écrit :

$$p(S_{\text{mole}} - b_{\text{mole}}) = RT$$

(pour une mole);

$$p(S - b) = RT/M$$

(pour 1g, M étant la masse moléculaire);

ou encore :

$$p(1/C - b) = RT/M,$$

C étant la concentration superficielle en g/cm² (*).

On en tire :

$$p(1 - bC) = \frac{RT}{M} C,$$

ou

$$1 - bC = \frac{RT}{M} \frac{C}{p} \quad (I)$$

Aux grandes dilutions $RT C/p$ tend vers M .

Ainsi, dans l'hypothèse d'une cosurface, le rapport C/p est une fonction linéaire de C .

Si l'on porte C/p en fonction de C à partir des résultats expérimentaux, les points encadrent correctement une droite dont l'extrapolation sur l'axe des ordonnées sert à calculer M (fig. 2).

La relation (I) montre que l'extrapolation des droites représentant C/p en fonction de C sur l'axe des concentrations fournit une valeur de C égale à $1/b$ (inverse de la cosurface).

On reviendra plus loin sur ce point.

Remarque.

J'ai été amenée, dans la plupart des cas, pour tracer la courbe $p-C$ dans le domaine du film gazeux, à extrapoler chaque pression au temps zéro, la pression correspondant à une certaine concentration superficielle n'étant pas toujours stable dans le temps

(*) En fait, on évalue pratiquement les concentrations en mg/m² et les surfaces en m²/mg.

(remontée d'impuretés en surface, dérive du zéro, courants de convection...). Comme il faut environ

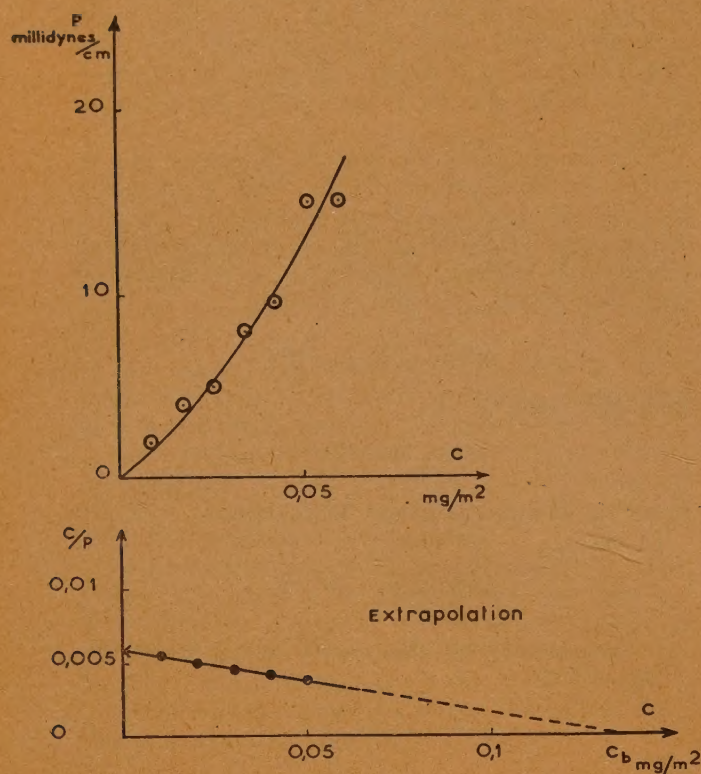


Fig. 2. — Oxyhémo-globine sur support pH 3,1.

deux ou trois minutes pour que l'alcool amylique utilisé pour l'étalement ait achevé de s'évaporer, on ne tient pas compte des lectures faites pendant, ce temps.

CHAPITRE III

COUCHES SUPERFICIELLES D'OXYHÉMOGLOBINE ET DE GLIADINE.

Les protéines sont généralement fragiles et sujettes, sous des influences diverses, à des modifications. Après son passage en surface la molécule ne se trouverait plus dans son état initial ou « natif ». On peut cependant penser qu'à chaque protéine, étalée dans des conditions bien définies, correspond un état superficiel caractéristique.

C'est pourquoi, avant d'essayer de rendre compte de transformations survenues dans la molécule protéique, je me suis efforcée, pour les protéines étudiées ici (oxyhémo-globine et gliadine), d'établir l'isotherme $p - C$ de la protéine « native ».

GUASTALLA (³⁷) avait constaté en 1939 que la masse moléculaire de l'oxyhémo-globine de cheval étalée sur HCl 0,01 N était de 11 000 environ, ce qui pouvait correspondre à six fragments (peut-être quatre hèmes et deux globines). (Quelques mesures effectuées sur support voisin de la neutralité avaient paru conduire à une valeur proche de 70 000.)

J'ai donc commencé ce travail dans l'intention de contrôler cette expérience, d'identifier si possible les fragments, et de voir, de plus, si cette scission était bien une conséquence du pH du support et non de l'étalement.

L'oxyhémo-globine, étant relativement bien connue, a l'avantage de permettre des comparaisons entre les résultats obtenus par la technique superficielle et ceux obtenus par d'autres méthodes. Quant à la gliadine je l'ai surtout employée comme matériel de contrôle, son étalement étant facile et certains de ses caractères superficiels connus. D'autre part, étant peu soluble dans l'eau, elle a permis de mettre en évidence des différences entre son comportement et celui de l'oxyhémo-globine hydrosoluble.

Préparations.

L'OXYHÉMOGLOBINE humaine est préparée vers 4° C. Les globules rouges, après lavages avec une solution de NaCl à 1 %, suivis de centrifugations, sont hémolysés par de l'eau distillée. Les stromas extraits au toluène sont éliminés par filtration. On recommence plusieurs fois l'opération pour avoir une oxyhémo-globine très pure. Les solutions mères sont dosées au spectrophotomètre de Beckman (la teneur en fer est de 5 à 10 milliatomes par litre, ce qui correspond à des concentrations d'oxyhémo-globine de 85 à 170 g/l) et ne contiennent pratiquement pas de méthémoglobine. Elles sont conservées à la glacière sans altération appréciable pendant deux ou trois semaines. Les solutions employées pour l'étalement (d'environ 0,1 à 1 g/l) sont diluées dans des tampons phosphates M/45 pH 7,4. Plus fragiles que les solutions mères, elles doivent être utilisées dans les quelques heures qui suivent leur préparation. Une trace d'alcool amylique nécessaire à un bon étalement est incorporée à l'aide d'un fil de platine dans 1 ou 2 cm^3 de solution, *immédiatement avant l'expérience* pour éviter les risques de dénaturation.

La GLIADINE est préparée suivant un procédé indiqué par ARRHÉNIUS (⁷) permettant d'obtenir un produit homogène. La gliadine (obtenue en poudre) est très peu soluble dans l'eau. Les solutions utilisées pour l'étalement sont préparées à partir de parcelles dissoutes dans de l'alcool éthylique à 70 %.

Conditions d'étalement.

Alors que l'étalement de la gliadine est facile soit à partir de parcelles solides, soit à partir de solutions,

la mise au point d'une technique d'étalement quantitatif pour l'oxyhémoglobine, respectant l'intégrité de la molécule, a été délicate.

Le film doit être étalé dans son état gazeux.

On a vérifié la reproductibilité des résultats pour les concentrations utilisées (environ de 0,1 à 1 g/l). Je n'ai constaté *en surface* aucun effet particulier dû à la dilution, dans ce domaine de concentrations tout au moins.

Signalons que les mesures ont été faites à la température du laboratoire (entre 20 et 25° C). L'expérience ayant montré que de petits écarts de température étaient sans influence sur les résultats, il n'a pas été nécessaire d'installer un dispositif pour travailler à température rigoureusement constante.

Remarque.

J'ai remarqué, au cours de ces expériences, que lorsqu'on étalait sur un même support, à partir d'une même solution, des quantités différentes de protéine et que l'on portait sous pression donnée les aires en fonction des volumes de solution déposée, la droite obtenue ne passait pas toujours par l'origine. Il faut retrancher une aire S' de l'aire du film S .

S' est peut-être due à des impuretés provenant du support, ou encore à une fixation d'alcool amylique à la surface du support en présence du film protéique. Un fait analogue a été signalé par L. TERMINASSIAN-SARAGA avec l'acide myristique et le benzène⁽⁶¹⁾: le benzène est retenu à la surface en présence du film.

Des expériences permettent d'affirmer que l'étalement du film n'est pas en cause.

La technique adoptée consiste à déterminer pour chaque série de mesures l'aire S' et à la retrancher de l'aire du film S .

Isotherme $p - C$ caractéristique et masse moléculaire de la molécule superficielle.

OXYHÉMOGLOBINE.

Sauf dans le cas de protéines stables dans un grand domaine de pH, il est nécessaire que le support ait un pH voisin du pH isoélectrique si l'on veut obtenir une masse moléculaire correspondant à celle obtenue par d'autres méthodes pour la molécule native en solution.

J'ai employé, pour tamponner les supports au voisinage de pH 7, pH voisin du pH isoélectrique de l'oxyhémoglobine⁽⁶⁰⁾, deux sortes de tampons phosphates: $(\text{PO}_4\text{HNa}_2 + \text{PO}_4\text{H}_2\text{K})\text{M}/45$ et $(\text{PO}_4\text{H}_2\text{K} + \text{PO}_4\text{HK}_2)\text{M}/25$, suffisamment dilués pour éviter les risques de modifications de la molécule protéique dues à la forte teneur en ions des supports. (Dans les premières expériences on prenait, à titre de

base, la courbe $p - C$ faite sur l'eau distillée, mais l'étalement y est difficile.)

Courbe $p - C$ (fig. 3).

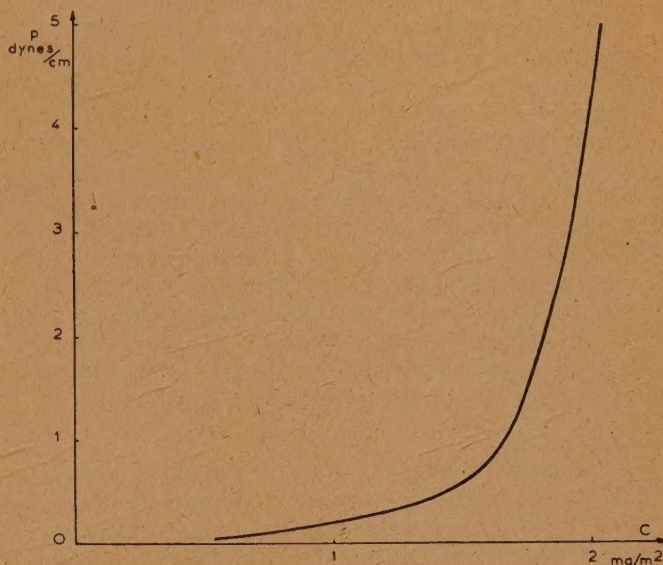


Fig. 3. — Isotherme $p - C$ caractéristique de l'oxyhémoglobine sur tampon pH 6,85 (20° C).

Les résultats obtenus avec de multiples échantillons d'oxyhémoglobine sont concordants à 5 ou 10 % près. On a adopté comme valeurs moyennes:

$$\begin{aligned} C_{(1 \text{ dyne})} &= 1,6 \text{ mg/m}^2 \\ C_{(5 \text{ dynes})} &= 2,0_5 \text{ mg/m}^2. \end{aligned}$$

J'ai pris alors par la suite ces valeurs comme critère d'une bonne préparation d'oxyhémoglobine non encore altérée (le vieillissement, la congélation, etc... provoquent en effet des modifications dans les courbes $p - C$).

Masse moléculaire (fig. 4).

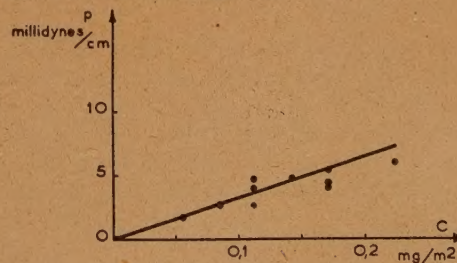


Fig. 4. — Isotherme de l'oxyhémoglobine: état gazeux sur tampon pH 6,9 (20° C). $M \approx 75\,000$.

La masse moléculaire a été déterminée avec le micromanomètre qui permet d'atteindre des pressions suffisamment basses pour que le film se trouve dans l'état gazeux (le domaine de cet état est restreint pour l'oxyhémoglobine)⁽⁴⁶⁾.

Les valeurs obtenues (70 à 80 000) sont un peu supérieures à la valeur classique (68 000) obtenue par d'autres méthodes (4, 19, 54, 58). L'incertitude liée à la faiblesse des pressions mesurées n'explique pas cet écart systématique, en rapport peut-être avec des étalements qui au voisinage du pH isoélectrique ne seraient pas absolument quantitatifs. Le fait de trouver pour la molécule superficielle une valeur comparable à celle de la molécule en solution, déjà signalé par GUASTALLA sur l'ovalbumine et la gliadine (36), et par POURADIER (56) sur les gélatines, confirmé depuis aussi par BULL (15) pour de nombreuses protéines, n'est nullement en désaccord avec l'hypothèse d'une modification de la molécule native en surface, par exemple d'un changement de forme.

Rappelons que, comme avec l'osmométrie, si les unités étalées ne sont pas toutes identiques, cette méthode permet seulement de compter les fragments. On obtient une masse moléculaire moyenne.

GLIADINE.

J'ai établi l'isotherme $p - C$ caractéristique sur HCl N/100, support très couramment utilisé pour cette protéine malgré son éloignement du pH isoélectrique. [La gliadine est d'ailleurs stable dans un large domaine de pH (43).] Elle est caractérisée par une absence de tronçon intermédiaire (fig 5).

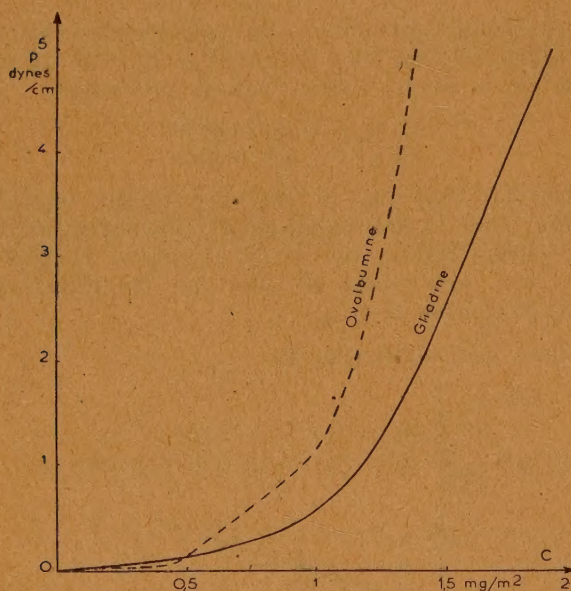


Fig. 5. — Sur HCl 0,01 N (20° C).
Ovalbumine : 3 tronçons.
Gliadine : 2 tronçons.

La courbe de l'état gazeux et la courbe des hautes pressions se raccordent par un arrondi continu (*).

(*) Les valeurs des concentrations superficielles trouvées avec cet échantillon de gliadine sont, sous pression donnée, un peu supérieures à celles déterminées par GUASTALLA sur un autre échantillon (37).

La masse moléculaire (sur HCl N/100) pour l'échantillon utilisé est de 26-27 000, valeur en accord avec les résultats d'ARRHÉNIUS (7) (à l'ultracentrifugeuse) et de GUASTALLA (37) (au micromanomètre superficiel). J'ai utilisé ici la seringue superficielle. En étalant le film dans la seringue à partir de parcelles solides, on évite l'emploi de l'eau alcoolique comme solvant d'étalement et les erreurs qu'entraîne l'alcool dans la mesure des pressions extrêmement faibles (quelques millidynes) par suite de son évaporation très lente.

Ces expériences confirment que la forme de l'isotherme superficielle $p - C$ est, dans des conditions données, caractéristique de l'espèce protéique étalée. Une modification de cette isotherme peut, par suite, servir à repérer une altération survenue dans la protéine native.

La masse moléculaire de la molécule superficielle a une valeur comparable à celle de la molécule en solution. Il ne semble donc pas que l'emploi de solutions protéiques très diluées (inévitables avec cette méthode) ait provoqué, dans le cas de l'oxyhémoglobine, une dissociation comme cela a pu être constaté par certaines observations à l'ultracentrifugeuse (au cours de mesures faites vers 20° C) (60, 62). Il est possible qu'une question de température soit ici en cause (*) comme le signale ADAIR (5) qui n'a trouvé, au cours de mesures de pressions osmotiques faites à 1° C, aucune dissociation due à la dilution sur de la carboxyhémoglobine de cheval. Par ailleurs ceci permet déjà de penser que la valeur très faible trouvée pour l'oxyhémoglobine sur HCl N/100 n'est pas une conséquence de l'étalement mais bien plutôt de l'acidité du support. C'est pourquoi j'ai alors étudié l'influence du pH du support sur les films protéiques et, en premier lieu, sur ceux d'oxyhémoglobine.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DU pH DU SUPPORT SUR LE COMPORTEMENT DE LA MOLÉCULE SUPERFICIELLE.

Les protéines sont formées de molécules qui gardent généralement en solution une masse moléculaire constante à l'intérieur d'une certaine zone de pH qui encadre le pH isoélectrique et s'étend sur un certain nombre d'unités de pH, plus ou moins grand

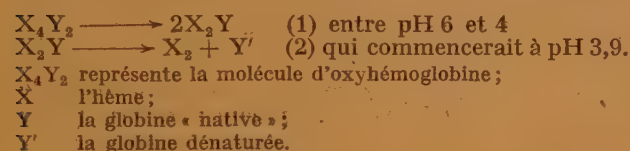
(*) Rappelons que les solutions très diluées étaient préparées peu de temps avant les expériences et ne quittaient la glacière où elles étaient conservées que pendant quelques minutes, au moment de leur emploi.

suivant la protéine. En dehors de cette zone de stabilité il peut se produire des scissions ou des associations. On se propose ici de vérifier si la molécule a, en surface, un comportement analogue.

1° Influence du pH du support sur la molécule superficielle d'oxyhémoglobine.

Rappelons que l'hémoglobine est constituée par une partie protéique ou globine dont la composition varie avec l'espèce, et par un groupe prosthétique formé de quatre protohèmes, chaque hème étant formé de quatre noyaux pyrroliques combinés à un atome de fer bivalent. Les hèmes seraient fixés à la surface de la globine (30, 42, 52) : la liaison se ferait entre le fer et la globine (peut-être un groupe imidazol de l'histidine) (64).

En solution l'oxyhémoglobine est sensible à l'action des acides. Il est possible d'après certains auteurs qu'une légère acidification provoque dans la molécule une scission en deux moitiés (51). L'action d'un acide concentré (HCl 0,1 N) conduit par contre à la rupture de la liaison hèmes-globine (6). D'après NEURATH et al. (51) la réaction se ferait en somme en deux temps :



Les solutions d'oxyhémoglobine à étaler (0,1 à 0,5 g/l) étaient tamponnées à pH 7,4. J'ai utilisé deux sortes de supports :

- des solutions HCl plus ou moins concentrées (0,1 N à 0,00001 N) allant de pH 1 à 5 ;
- des solutions tampons de pH 2,4 à 7,4 : biphtalate de potassium M/40 + HCl ou KOH, puis des tampons phosphates de potassium dont la concentration totale était M/25. [On s'est aussi servi parfois de tampons $(PO_4HNa_2 + PO_4H_2K)M/45$.]

Pour permettre une meilleure comparaison on a fait toute une série d'expériences en gardant la concentration totale en ions K^+ constante et égale à M/20, sur toute la gamme de pH étudiée, par addition de KCl.

Comme on le voit les tampons employés étaient suffisamment dilués pour éviter les risques toujours possibles de scission (dus à une trop grande teneur en ions) qui pourraient masquer l'action propre du pH. On a vérifié que la nature du tampon ne jouait pas.

Le simple aspect des courbes $p - C$ aux moyennes pressions (fig. 6) montre que la molécule superficielle est sensible au pH du support. Jusque vers pH 6 il a peu d'influence sur les isothermes, puis la concentration sous pression donnée diminue nettement : sous 5 dynes/cm elle passe de 2 mg/m² à une valeur

moitié environ entre pH 5 et 4, ce qui pourrait être l'indice d'une transformation profonde de la molécule (9).

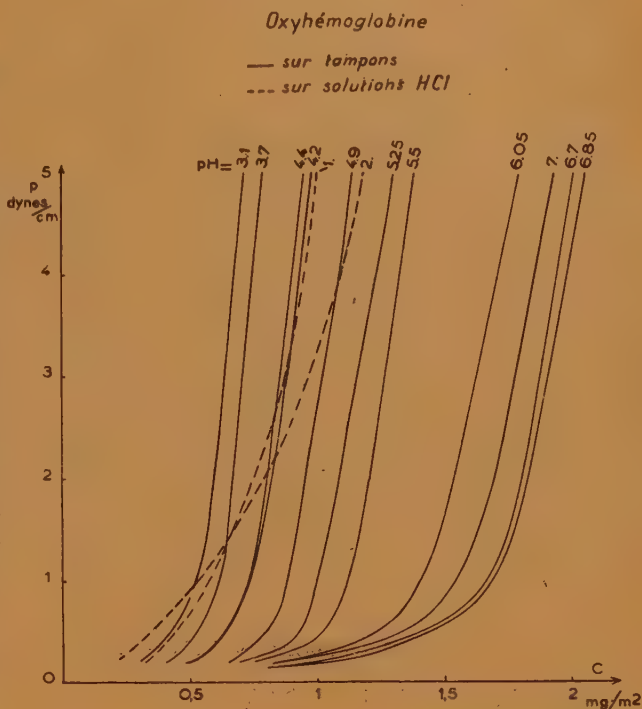


Fig. 6. — Influence du pH du support sur les courbes de compression de l'oxyhémoglobine.

Aux pH très acides les courbes de compression ont une forme très différente. Les films sont moins compressibles dans le domaine des tronçons intermédiaires.

Etude du film gazeux. Détermination des masses moléculaires (au micromanomètre) (9).

Les mêmes supports ont été employés. Les valeurs trouvées sont comparables à même pH sur les deux sortes de supports, (solutions d'HCl et solutions tampons) ce qui montre que, seul, le pH est responsable des modifications de la masse moléculaire. Des mesures ont été faites à pH 8 sur un tampon borate (acide borique M/40 + KCl M/40 + NaOH M/40).

J'ai rassemblé les résultats sur une courbe (fig. 7) ; j'ai porté en ordonnées les masses moléculaires M et en abscisses le pH du support. J'ai ainsi mis en évidence, en fonction du pH, un domaine de stabilité de la molécule entière ($M = 70$ à $80\,000$) s'étendant de pH 8 à 5,7 ; puis les molécules sont rompues en deux fragments : $M = 35\,000$, de pH 5 à 4. De pH 4 à 1 il y a une scission plus progressive de la

molécule qui aboutit à la formation de nombreux fragments superficiels.

pH = 2 $M \approx 11\,000$
pH = 1 $M \approx 9\,000$.

nouvelle espèce chimique était au voisinage de son pH isoélectrique, puis elle augmente à nouveau jusque vers pH 4. De pH 4 à 1 la cosurface varie peu (vers pH 4 la molécule se scinde en plus de deux

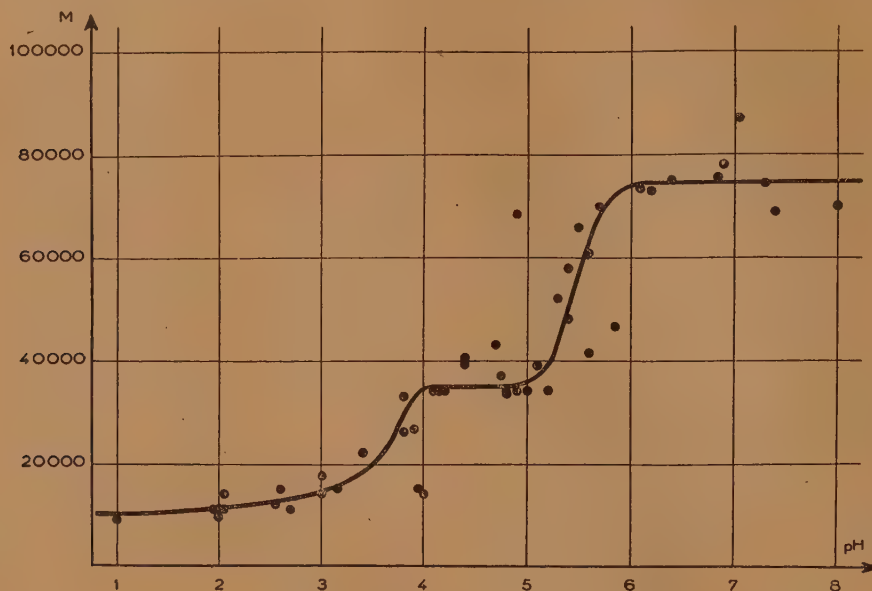


Fig. 7. — Masses moléculaires de l'oxyhémo-globine en fonction du pH du support.

Remarque :

D'un échantillon d'oxyhémo-globine à l'autre il y a de petites différences de stabilité qui sont probablement à l'origine des points aberrants de la courbe, notamment aux zones de transition.

Cosurfaces.

L'écart à la loi des films idéaux dans le domaine du film gazeux conduit à la notion de « cosurface » qui est sans doute en relation avec l'encombrement de la molécule superficielle *libre* telle qu'elle se trouve dans le film gazeux sans la contrainte d'une pression superficielle élevée.

Rappelons que la cosurface b se calcule à partir de la concentration de cosurface C_b ($C_b = \frac{1}{b}$) qui est déterminée par extrapolation pour $C/p = 0$ de la droite C/p en fonction de C (fig. 2).

La mesure de la cosurface b et de ses variations en fonction du pH est délicate. Les résultats pour l'oxyhémo-globine⁽⁹⁾, encore imprécis, ne sont donnés qu'à titre d'indication. Sur la figure 8 on a porté en fonction du pH les valeurs de b . La cosurface petite au pH isoélectrique augmente notablement jusqu'à la première scission de la molécule (pH 5) comme si la molécule se distendait avant de se rompre. Aussitôt après, la cosurface redevient petite, comme si la

fragments; or il semble bien que dans ce domaine de pH la cosurface diminue encore une fois, avant de prendre une valeur voisine de 7 à 8 m²/mg qu'elle conserve aux plus grandes acidités).

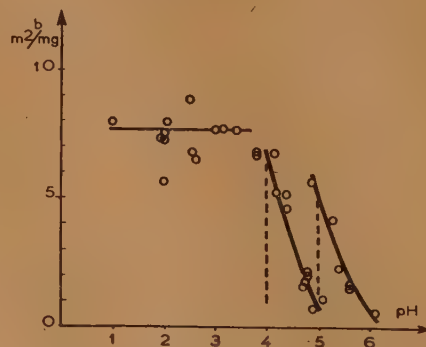


Fig. 8. — Variation des cosurfaces en fonction du pH du support (oxyhémo-globine).

Par analogie avec le comportement des macromolécules en solution, on peut penser qu'une molécule insoluble est plus ramassée en surface qu'une molécule soluble. Dans ces conditions sa cosurface devrait être très petite.

Cette hypothèse et l'interprétation de la cosurface semblent justifiées par les faits expérimentaux suivants :

— Pour l'oxyhémoglobine, au voisinage du pH isoélectrique où la molécule est relativement insoluble (donc ramassée) la cosurface est en effet petite.

— Dans le cas de la gliadine (peu soluble dans l'eau) la cosurface est très petite et son évaluation est difficile (courbe à deux tronçons).

— C'est ce qui se produit aussi avec l'oxyhémoglobine lorsqu'on ajoute dans le support un précipitant tel que le sulfate d'ammonium.

— Par ailleurs des évaluations faites récemment sur les cosurfaces de hauts polymères en solution dans des solvants où ils sont plus ou moins solubles sont à mettre en parallèle avec ces résultats ⁽⁵⁷⁾.

2° Influence du pH sur la molécule superficielle de gliadine.

Les courbes p — C établies, soit sur des solutions HCl plus ou moins diluées (depuis 0,01 N à 0,00001 N), soit sur des tampons à pH 2,2-3-4-5-6 (biphtalate de potassium M/20 + HCl ou NaOH), sont toutes dépourvues de tronçon intermédiaire; la molécule superficielle semble dans le domaine des moyennes pressions beaucoup moins sensible au pH que celle d'oxyhémoglobine. Les masses moléculaires, par contre, varient. De plus, la nature du support semble jouer un rôle puisque sur support HCl 0,001 N on observe un minimum dans les valeurs ($M = 13\ 000$), alors que sur tampon M passe de 27 000 entre pH 2 et 3 à une valeur double entre pH 4 et 6 (fig. 9). (Sur l'eau distillée la masse moléculaire est de 29 000 environ.)

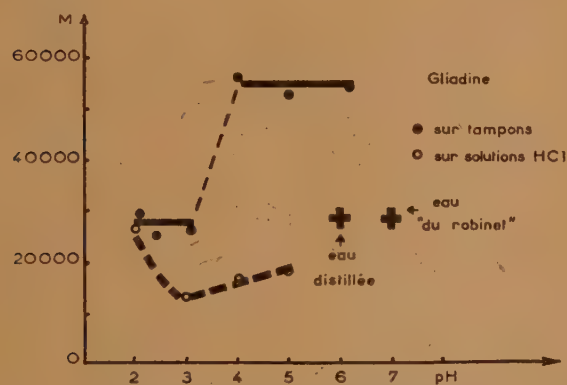


Fig. 9. — Masses moléculaires de la gliadine étalée sur différents supports.

Les résultats sont difficiles à interpréter ici. La gliadine est parfois considérée comme une protéine non homogène ^(11, 43). La cosurface, toujours très petite, indique que la molécule, peu soluble dans l'eau, est très ramassée.

En résumé, on voit que la molécule protéique est sensible au pH du support et subit des transformations

que le simple examen des isothermes aux moyennes pressions permet souvent de déceler.

La molécule superficielle d'oxyhémoglobine est, comme la molécule en solution, stable dans un certain intervalle de pH (6 à 8, c'est-à-dire le même que celui trouvé par Svedberg à l'ultracentrifugeuse sur l'hémoglobine) ⁽⁵⁸⁾. Il existe également en surface des demi-molécules qui seraient stables approximativement entre pH 4 et 5 [en solution NEURATH, *et al.* ⁽⁵¹⁾ ont signalé la présence de demi-molécules dans un domaine de pH voisin]. Leur formation s'expliquerait par la rupture, au niveau du plan de symétrie de la molécule entière, d'une liaison assez labile entre les deux moitiés de molécule.

Les transformations plus profondes ne pourraient se faire qu'à des pH plus acides.

La masse moléculaire de 11 000 signalée par GUASTALLA est bien une conséquence de l'acidité du support.

La mesure des cosurfaces permettrait d'avoir une idée de l'encombrement de la molécule qui paraît dépendre du pH et de la composition du support.

Remarquons que les courbes de compression d'une protéine hydrosoluble et d'une protéine peu soluble n'ont pas la même forme : trois tronçons dans le premier cas, deux dans le second (fig. 5).

CHAPITRE V

AIRE DE LA MOLECULE SUPERFICIELLE A HAUTE PRESSION.

Associée à la mesure de la masse moléculaire, l'étude de l'encombrement de la molécule protéique sous pression donnée m'a permis de préciser le mécanisme de certaines scissions moléculaires, notamment celui de la scission entre pH 4 et 5.

Il semble que ce soit tout au haut de la courbe des hautes pressions, au début de l'inflexion de cette courbe, qu'il faille chercher les renseignements les plus intéressants.

En effet, rappelons que lorsqu'on comprime sur un support liquide une couche superficielle d'acide gras on arrive à une aire moléculaire au-dessous de laquelle ce film n'est plus stable (« collapse »). Si l'on poursuit la compression il se produit un équilibre entre la couche monomoléculaire et la phase tridimensionnelle. L'expérience montre que, pour les acides gras saturés, l'aire de la molécule du film dans ces conditions ^(3, 20) est de l'ordre de grandeur de la section droite de la molécule dans le cristal (déterminée aux rayons X) ⁽⁴⁸⁾. Si l'on comprime des films protéiques, on constate sur la courbe pressions-surfaces, entre 20 et 30 dynes/cm, malgré la difficulté des mesures (film imparfaite-

ment stable), une sorte d'inflexion comparable à un point de « collapse » (14, 50, 65); on peut essayer de rapprocher l'aire de la molécule superficielle

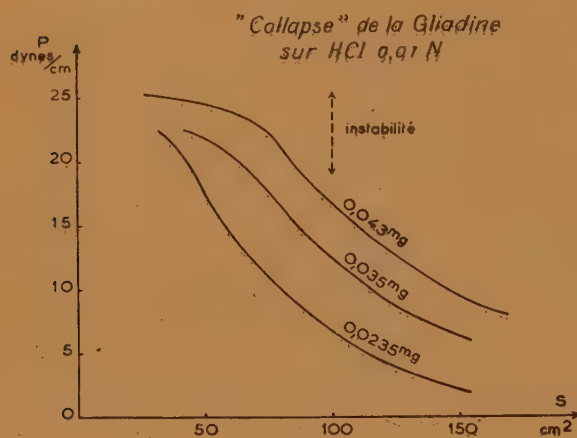


Fig. 10.

en ce point de l'aire de la base de la molécule dans le cristal. Certains auteurs admettent que c'est en ce point qu'une molécule d'une couche superficielle protéique occupe l'aire la plus petite possible (14, 50).

J'ai d'abord vérifié sur la gliadine (étalée à partir de solutions) que le point considéré comme point

déterminées à cette pression on peut déduire « l'épaisseur moyenne » du film (en prenant comme densité de la protéine dans le film la valeur 1,3) (**) et l'ordre de grandeur de l'aire occupée par une molécule superficielle sur le support connaissant la masse moléculaire M (***).

Les résultats obtenus avec des échantillons d'oxyhémoglobine humaine, dont les solutions de 0,1 à 0,3 g/l diluées dans des tampons phosphates M/45 pH 7,4 étaient étalées sur différents supports, sont résumés dans le tableau I ci-après.

L'appareil utilisé est le manomètre à suspension pendulaire dont la pièce pendulaire est surchargée; un déplacement du spot de 0,5 cm correspond à 1 dyne/cm.

Interprétation des résultats.

Avant de rendre compte des résultats rassemblés dans le tableau I, il est indispensable de donner un bref aperçu sur la taille et la forme de la molécule d'hémoglobine (ou de ses dérivés) telle qu'elle est envisagée par certains auteurs dans la matière tridimensionnelle, notamment dans le cristal (diffraction des rayons X). Rappelons pour mémoire que BOYES WATSON, DAVIDSON et PERUTZ (16) décrivaient autrefois la molécule de méthémoglobine comme un cylindre formé de quatre couches protéi-

TABLEAU I.

Support liquide	pH	M	Pression de collapse (dynes/cm)	Concentration superficielle au collapse (mg/m²)	« Epaisseur moyenne » du film (Å)	Aire occupée par une molécule (Å²)
(Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄)M/45...	7	70.000	22	3,3	25	3.500
(KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄)M/25...	6,9	70.000	22	3,4	26	3.400
Biphthalate de potassium M/40.	4,55	35.000	22	1,9 ₆	15	3.000
et KOH.....	4,5	35.000	22	1,8	14	3.200
HCl N/100.....	2	11.000	20-21	2	15	900
HCl N/10.....	1	9.000	20-21	1,9	15	800

de « collapse » (*) (vers 22 dynes/cm) (fig. 10) est proche de la pression limite (25 à 26 dynes/cm) obtenue par étalement spontané de gliadine solide, pression qui *pourrait* correspondre à un équilibre entre le film et la parcelle.

« Collapse » de l'oxyhémoglobine (10).

Les courbes pressions-surfaces de l'oxyhémoglobine étalée sur différents supports présentent à haute pression, comme celles de la gliadine, un point d'inflexion, dont la hauteur varie légèrement suivant la nature du support. Des concentrations superficielles

(*) Cf. HUGHES et RIDEAL (38) qui ont adopté une valeur un peu différente de la nôtre.

ques dont la hauteur serait 34 Å et le diamètre de base 57 Å. Les mesures de DERVICHIAN, FOURNET et

(**) Un film même condensé est souvent plus lacunaire que la substance dans son état tridimensionnel solide ou liquide. En conséquence, la valeur de l'épaisseur ainsi calculée n'a pas de signification absolue.

(***) Epaisseur moyenne

$$e = \frac{C}{d} \times 10^{-3} \times 10^{-4} \text{ cm} = \frac{C}{d} \times 10 \text{ Å}$$

où C est la concentration superficielle en mg/m² et d la densité de la substance tridimensionnelle.

Aire de la molécule superficielle :

$$\sigma = \frac{M \times 10^3 \times 10^4}{C \times N} \text{ cm}^2 = \frac{M}{6C} \text{ Å}^2.$$

(N nombre d'Avogadro)

GUINIER ⁽²³⁾ dans des solutions d'hémoglobine (diffusion des rayons X) semblaient indiquer que ce cylindre était également une des structures possibles pour la molécule en solution.

Depuis, de nouvelles mesures aux rayons X, ont conduit PERUTZ et BRAGG ^(17, 18) à remanier leurs vues. D'après eux les hémoglobines d'espèces différentes sont très similaires quant à leur structure générale. Il est encore trop tôt pour savoir quelle est la structure détaillée de la molécule mais il est certain qu'elle est beaucoup plus complexe qu'une simple image de chaînes parallèles. La forme générale serait celle d'un ellipsoïde. D'après les données aux rayons X, la longueur de deux axes serait de 55 Å, et celle du troisième 65 Å. Il existe donc une section de la molécule à peu près circulaire avec un diamètre de 55 Å.

Examinons maintenant ce qui se passe dans le cas de la molécule superficielle.

1^o Au voisinage du pH isoélectrique, dans les conditions où la molécule est entière ($M = 70\,000$), l'aire de base de la molécule superficielle se rapproche de l'aire occupée par une molécule dans le cristal. (Une molécule à projection circulaire ayant pour diamètre 55 Å aurait dans le film, suivant que l'assemblage en serait triangulaire ou carré, une aire d'environ $2\,600\text{ Å}^2$ ou d'environ $3\,050\text{ Å}^2$.) Ceci serait en faveur de l'hypothèse suivant laquelle à l'inflexion de la courbe de compression les molécules seraient aussi serrées que dans un cristal.

On suppose dans le calcul précédent que dans le film comprimé le grand axe de la molécule est perpendiculaire à la surface, notamment à la pression de collapse. C'est ce que Devaux avait montré autrefois en plaçant des grains de blé sur du mercure ⁽²⁵⁾ : sous l'effet de la compression ceux-ci se redressent et se placent perpendiculairement à la surface.

Il conviendrait d'étudier encore un certain nombre de protéines par la technique superficielle et par des techniques différentes pour être certain que l'accord signalé n'est pas une coïncidence.

Par ailleurs les valeurs de « l'épaisseur moyenne » du film se rapprochent plus de la hauteur du cylindre proposé autrefois (34 Å) pour représenter une molécule que du grand axe de l'ellipsoïde (65 Å). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans le cas de molécules cylindriques, les lacunes entre les molécules du cristal ou du film sont à peu près les mêmes, alors que dans le cas de l'ellipsoïde, la place, partiellement comblée par d'autres molécules dans le cristal, ne peut l'être de la même manière dans la couche superficielle (même au maximum de compression) qui serait alors beaucoup plus lacunaire que le cristal.

2^o Dans les conditions où la molécule est scindée en deux fragments ($4 < \text{pH} < 5$) l'« épaisseur »

du film diminue de moitié et l'aire de base de chacune des moitiés reste sensiblement la même. La scission de la molécule native se ferait suivant un dédoublement en hauteur (fig. 11).



Fig. 11.

3^o A pH 2 sur HCl 0,01 N on a peut-être six fragments et à pH 1 sur HCl 0,1 N peut-être huit. La scission se ferait comme suit (fig. 11 bis) :



Fig. 11 bis.

Mais la valeur de la masse moléculaire obtenue est une valeur moyenne et rien ne prouve que les fragments soient tous de même taille.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) M. ABRIBAT et A. DOGNON. — *J. de Phys. et Rad.*, 1939, 10, 22.
- (2) M. ABRIBAT et J. POURADIER. — *C. R. Ac. Sc.*, 1948, 227, 1101.
- (3) N. K. ADAM. — *Proc. Roy. Soc.*, 1922, A, 101, 452.
- (4) G. S. ADAIR. — *Proc. Roy. Soc.*, 1925, A, 108, 627.
- (5) G. S. ADAIR. — *Haemoglobin*, London, Butterworth, 1949, p. 191.
- (6) N. L. ANSON et A. E. MIRSKY. — *J. Gen. Physiol.*, 1930, 13, 469.
- (7) S. ARRHENIUS. — *J. Chem. Phys.*, 1937, 5, 67.
- (8) W. T. ASTBURY, F. O. BELL, E. GORTER et J. VAN ORMONDT. — *Nature*, 1938, 142, 33.
- (9) N. BENHAMOU. — *J. Chim. Phys.*, 1951, 48, 624.
- (10) N. BENHAMOU. — *C. R. Ac. Sc.*, 1954, 238, 1316.
- (11) M. S. BLISH. — *Ad. Prot. Chem.*, 1945, 2, 337.
- (12) H. B. BULL. — *J. Biol. Chem.*, 1938, 125, 585.
- (13) H. B. BULL. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, 67, 4.
- (14) H. B. BULL. — *Ad. Prot. Chem.*, 1947, 3, 95.
- (15) H. B. BULL. — *J. Biol. Chem.*, 1950, 185, 27.
- (16) J. BOYES-WATSON, E. DAVIDSON et M. F. PERUTZ. — *Proc. Roy. Soc.*, 1947, A, 191, 83.
- (17) W. L. BRAGG et M. F. PERUTZ. — *Proc. Roy. Soc.*, 1952, A, 213, 425.
- (18) W. L. BRAGG et M. F. PERUTZ. — *Acta Cryst.*, 1952, 5, 277 et 323.
- (19) N. F. BURK et D. M. GREENBERG. — *J. Biol. Chem.*, 1930, 87, 197.
- (20) D. G. DERVICHIAN. — *Thèse, Ann. Phys.*, 11^e série, 1937, 8, 361.
- (21) D. G. DERVICHIAN. — *Nature*, 1939, 144, 629.
- (22) D. G. DERVICHIAN. — *J. Chem. Phys.*, 1943, 11, 236.
- (23) D. G. DERVICHIAN, G. FOURNET et A. GUINIER. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 110.
- (24) H. DEVAUX. — *Proc. Verb. Sté. Sc. Phys. Nat.*, Bordeaux, novembre 1903.

- (25) H. DEVAUX et L. PALLU. — *C. R. Ac. Sc.*, 1938, 206 1693.
(26) E. FREDERICQ. — *Biochim. et Biophys. Acta*, 1952, 9 601.
(27) E. GORTER. — *Proc. Roy. Academy. Amsterdam*, 1932, 35, 838.
(28) E. GORTER et F. GRENDL. — *Trans. Far. Soc.*, 1926, 22, 477.
(29) L. GOUGEROT. — *Thèse*, Paris, 1947.
(30) S. GRANICK. — *J. Gen. Physiol.*, 1942, 25, 571.
(31) J. GUASTALLA. — *C. R. Ac. Sc.*, 1929, 189, 241.
(32) J. GUASTALLA. — *C. R. Ac. Sc.*, 1938, 206, 993.
(33) J. GUASTALLA. — *C. R. Ac. Sc.*, 1939, 208, 973.
(34) J. GUASTALLA. — *C. R. Ac. Sc.*, 1939, 208, 1078.
(35) J. GUASTALLA. — *Cah. de Phys.*, 1942, 10, 30.
(36) J. GUASTALLA. — *Cah. de Phys.*, 1943, 13, 5.
(37) J. GUASTALLA. — *Thèse, Mem. Serv. chim. de l'Etat*, 1947, 33, 265.
(38) A. H. HUGHES et E. K. RIDEAL. — *Proc. Roy. Soc.*, 1932, A 137, 62.
(39) K. IMAHORI. — *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1952, 25, 121.
(40) M. JOLY. — *C. R. Ac. Sc.*, 1939, 208, 975.
(41) J. H. P. JONXIS. — *Biochem. J.*, 1939, 33, 1743.
(42) D. KEILIN. — *Nature*, 1953, 171, 922.
(43) L. KREJCI et T. SVEDBERG. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, 57, 946.
(44) I. LANGMUIR. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1917, 39, 1848.
(45) I. LANGMUIR. — *Cold Spring Harbor Symp. on Quant Biol.*, 1938, 6, 171.
(46) J. MICHEL et N. BENHAMOU. — *C. R. Ac. Sc.*, 1949, 228, 1577.
(47) J. S. MITCHELL. — *Trans. Far. Soc.*, 1937, 33, 1129.
(48) A. MULLER. — *Proc. Roy. Soc.*, 1927, A 114, 542.
(49) H. NEURATH. — *J. Phys. Chem.*, 1940, 44, 296.
(50) H. NEURATH et H. B. BULL. — *Chem. Revs.*, 1938, 23, 391.
(51) H. NEURATH, P. GREENSTEIN, F. W. PUTNAM et G. O. ERICKSON. — *Chem. Revs.*, 1944, 34, 57.
(52) M. F. PERUTZ. — *Haemoglobin*, London, Butterworth, 1949, p. 135.
(53) G. T. PHILIPPI. — *Thèse*, Amsterdam, 1936.
(54) R. B. PORTER et F. SANGER. — *Biochem. J.*, 1948, 42, 287.
(55) J. POURADIER et M. ABRIBAT. — *J. Chim. Phys.*, 1946, 43, 183.
(56) J. POURADIER. — *Thèse*, Paris, 1948.
(57) H. L. ROSANO. — *Mem. Serv. Chim. de l'Etat*, 1953, 38, 127.
(58) T. SVEDBERG. — *Trans. Far. Soc.*, 1930, 26, 740.
(59) T. SVEDBERG. — *Proc. Roy. Soc.*, 1939, B 127, 1.
(60) T. SVEDBERG et K. O. PEDERSEN. — *The Ultracentrifuge*, Oxford, 1940.
(61) L. TER MINASSIAN-SARAGA. — *J. Chim. Phys.*, 1955, 52, 95.
(62) A. TISELIUS et D. GROSS. — *Kolloid Z.*, 1934, 66, 11.
(63) L. WILHELMY. — *Ann. Phys. Chem.*, 1863, 119, 177.
(64) J. WYMAN. — *Ad. Prot. Chem.*, 1948, 4, 407.
(65) H. ZOCHER et F. STIEBEL. — *Z. Physik. Chem.*, 1930, 147, 401.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COUCHES MONOMOLÉCULAIRES DE PROTÉINES

II. — Quelques propriétés superficielles des dérivés de l'hémoglobine.

Molécule native et molécule superficielle.

CHAPITRE PREMIER

COMPORTEMENT DE LA GLOBINE EN COUCHES SUPERFICIELLES

J'ai étudié dans la première partie de ce travail l'action du pH du support sur la molécule superficielle d'oxyhémoglobine et les modes éventuels de scission de cette molécule.

J'ai ensuite essayé d'identifier les fragments correspondant à ces scissions successives en comparant le comportement superficiel de la globine et de l'oxyhémoglobine (on sait qu'en solution, sous l'action brutale des acides, l'oxyhémoglobine se sépare en ses constituants : hèmes et globine).

Signalons que les études sur la globine se sont toujours trouvées compliquées par le fait que la séparation de l'oxyhémoglobine en ses constituants s'accompagne d'une dénaturation de la partie protéique (¹, ²⁷, ³⁷, ³⁸).

Préparation.

L'obtention de globine dite « native » nécessite une préparation en plusieurs étapes : il faut réverser la globine dénaturée.

La globine utilisée est préparée suivant la méthode d'ANSON et MIRSKY (¹) remaniée par ROCHE et COMBETTE (³⁷). L'oxyhémoglobine (*) est attaquée

(*) On part plus généralement de la carboxyhémoglobine, le rendement étant meilleur (²⁷).

à 0° par HCl 0,1 N; la globine précipite par addition d'acétone chlorhydrique. La solution contient les hèmes sous forme de chlorhydrate d'hémine (Fe⁺⁺⁺). La globine dénaturée est « réversée » par de la soude, puis on élimine un des deux constituants présents par addition, en proportion convenable, d'une solution saturée de (NH₄)₂SO₄. D'après ROCHE et COMBETTE la solution obtenue renferme une protéine homogène correspondant à la globine « native ».

Les solutions étaient toujours conservées à la glacière mais au bout de quelques jours de légères précipitations se produisaient. BOURILLON ayant montré que la stabilité de la globine était à peu près totale lorsqu'elle était en solution dans un tampon phosphates M/15 à pH voisin de 7 (⁵), j'ai conservé ainsi la dernière préparation (pH 6,8).

Les résultats se sont avérés concordants sur les trois solutions de globine qui m'ont servi au cours des expériences.

Le dosage des solutions était fait, soit par un dosage d'azote au Kjeldahl, soit au spectrophotomètre de Beckman dans la bande correspondant aux acides aminés cycliques (vers 275 mμ) (³, ²⁴).

Par la suite on a pu appliquer à la globine un dosage superficiel basé sur une constatation expérimentale : sur HCl 0,01N la concentration superficielle sous 2,5 dynes/cm est de 1 mg/m² environ.

Étude superficielle du pigment (²¹).

Les hèmes séparés de la globine sont laissés en solution dans l'acétone chlorhydrique où ils se trouvent probablement sous forme de chlorhydrate d'hémine.

J'ai constaté que cette solution s'étalait sur HCl N/100 et vérifié que les pressions mesurées n'étaient pas dues à l'acétone; celle-ci (soigneusement distillée) ne laisse pratiquement pas de film en surface. La courbe $p-S$ tracée au manomètre superficiel ne ressemble pas à celle des protéines. Le film est presque incompressible. Lors de la compression, la pression reste faible tant que les molécules ne sont pas en contact, puis elle croît très brusquement à partir d'une aire moléculaire où l'on peut considérer que les molécules sont jointives. Aux grandes dilutions, la pression n'a pu être évaluée, même avec les manomètres les plus sensibles (on peut penser que les molécules forment des agglomérats). Il se pourrait que les molécules d'hémine interviennent superficiellement par leur seul encombrement.

Étude superficielle de la globine.

La globine s'étale très facilement [JONXIS⁽²³⁾ l'avait déjà constaté] quels que soient le pH et la nature du support.

Les isothermes $p-C$ tracées à différents pH et comparées à celles de l'oxyhémoglobine (fig. 1) indiquent que ces deux protéines ont en surface un comportement différent, surtout au voisinage de la neutralité,

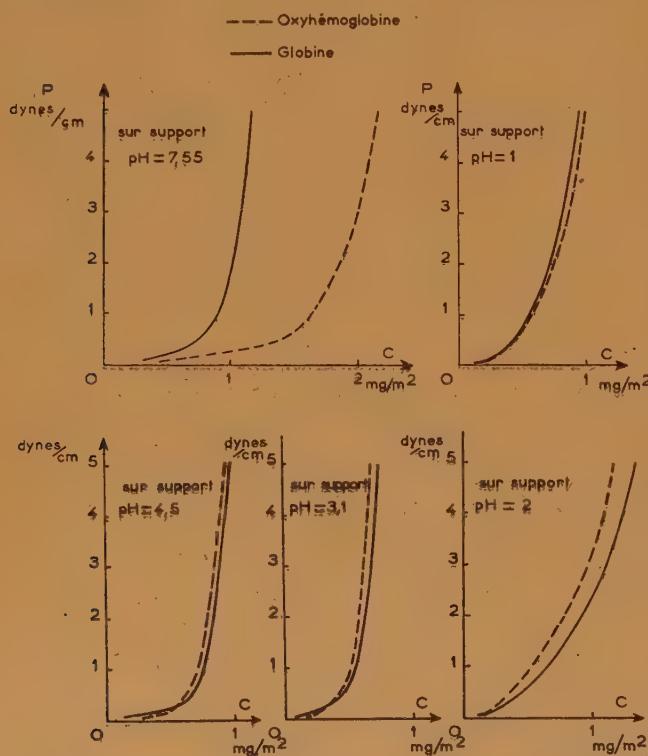


Fig. 1. — Comparaison des isothermes de la globine et de l'oxyhémoglobine sur des supports à différents pH.

A pH 7,5 les concentrations superficielles sous pression donnée sont nettement plus petites (près de deux fois) pour la globine que pour l'oxyhémoglobine, ce qui paraît indiquer que la masse moléculaire de la globine est au plus de 35 000 (on le confirmera ultérieurement).

A pH 4,5 et 3,1 les courbes $p-C$ pour la globine

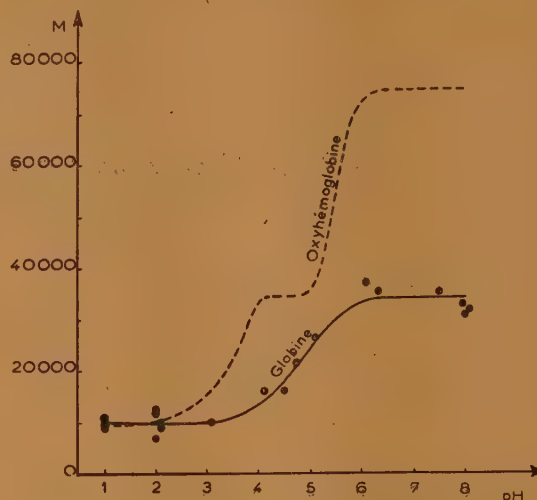


Fig. 2. — Variation des masses moléculaires de la globine en fonction du pH du support.

et l'oxyhémoglobine sont assez comparables, au moins dans le domaine des moyennes et des hautes pressions (elles diffèrent dans la région de l'état gazeux). Elles sont toujours analogues, mais légèrement décalées, à pH 2. Elles ne sont vraiment superposables dans toute leur étendue qu'à pH 1.

L'étude des masses moléculaires en fonction du pH (fig. 2) montre que la masse moléculaire de la globine stable de pH 6 à 8 est voisine de 35 000 [valeur en accord avec celles déterminées en solution par d'autres méthodes^(17, 36)].

Cette molécule de globine est elle-même moins stable que la moitié de molécule d'oxyhémoglobine, ce qui indiquerait qu'au palier de pH 4 à 5 les fragments d'oxyhémoglobine ne sont pas de la globine pure, mais que les hèmes y sont restés fixés (probablement une paire sur chaque fragment). Ceci reste en parfait accord avec le dédoublement en deux paquets envisagé précédemment et avec l'existence d'un plan de symétrie dans la molécule d'oxyhémoglobine.

De pH 3 à 1, la masse moléculaire, de 10 000 environ, ne varie pratiquement pas et se rapproche des valeurs trouvées pour l'oxyhémoglobine à pH 2 et 1. Ceci serait une confirmation de la non-intervention des hèmes comme unité cinétique indépendante, lorsque l'oxyhémoglobine est étalée dans ces conditions. Ainsi, c'est seulement à des pH suffisamment

acides (entre 2 et 3) que l'oxyhémoglobine se sépare en surface en ses constituants; le pH du support exerce alors la même action sur la globine ainsi libérée que sur la globine pure [certains auteurs ⁽³³⁾ admettent qu'en solution la séparation des hèmes et de la globine serait complète à pH 3].

Dans des conditions particulières (très faible concentration saline) j'ai pu mettre en évidence (sur « l'eau du robinet » par exemple) des molécules superficielles de masse moléculaire assez voisine de 70 000. Si cette structure existe, elle est en tous cas très instable.

Ainsi la globine en surface aurait des propriétés comparables à celles de la globine en solution; la valeur de sa masse moléculaire est de l'ordre de grandeur de celles obtenues (sur des globines de différentes espèces animales) par osmométrie [ROCHE et ADAIR ⁽³⁶⁾] et ultracentrifugation [GRALEN ⁽¹⁷⁾ qui pense du reste que la séparation d'hémoglobine en ses constituants est accompagnée d'une scission]; sa très grande instabilité permet de confirmer l'importance de la liaison hèmes-globine dans les propriétés de la protéine ⁽³⁸⁾.

Par ailleurs le comportement superficiel de la globine étant nettement différent de celui de l'oxyhémoglobine [GOUGEROT ⁽¹⁸⁾ avait déjà signalé que la globine mousse, au contraire de l'oxyhémoglobine] l'étalement seul ne peut suffire à provoquer la rupture de la liaison hèmes-globine.

CHAPITRE II

FILMS DE MÉTHÉMOGLOBINE. — COMPARAISON AVEC LES FILMS D'OXYHÉMOGLOBINE

Ayant contrôlé que l'étalement de l'oxyhémoglobine ne suffisait pas à rompre la liaison hèmes-globine, on s'est demandé si le film obtenu (après étalement des solutions d'oxyhémoglobine) était un film d'oxyhémoglobine ou de méthémoglobine (*). En effet, la formation de méthémoglobine à partir de l'oxyhémoglobine est relativement facile ⁽¹³⁾ et on pourrait craindre en surface une oxydation directe.

Préparation de la méthémoglobine.

Celle-ci était préparée par action du ferricyanure de potassium sur de l'hémoglobine.

(*) La méthémoglobine est le produit d'oxydation de l'hémoglobine avec changement de valence du fer



On fait le vide sur l'oxyhémoglobine (que l'on démousse au préalable pour éviter d'être gêné ultérieurement par l'abondance des mousses) pour la transformer en hémoglobine. Puis on fait agir sur cette hémoglobine un léger excès de ferricyanure de potassium: l'hémoglobine est alors oxydée en méthémoglobine.

La solution a une couleur brune caractéristique. Au spectrophotomètre la bande dans le rouge se situe vers 632 mμ ⁽¹⁴⁾ comme je l'ai vérifié sur une solution tamponnée à pH 7,2 par des tampons phosphates M/45.

Films de méthémoglobine.

J'ai établi l'isotherme caractéristique et déterminé la masse moléculaire sur support neutre de la méthémoglobine. J'ai ensuite étudié l'influence du pH du support. Des précautions particulières ont dû être prises pour la conservation des solutions vu l'instabilité de la méthémoglobine aux grandes dilutions. La différence de comportement des deux protéines en surface a nettement été mise en évidence au cours de ces expériences (courbes sur support neutre et sur HCl 0,01 N: fig. 3 et 4).

La valeur de la masse moléculaire (peut-être d'environ 46 à 49 000 à pH 6,9) prouverait qu'un certain nombre de molécules ont déjà subi une

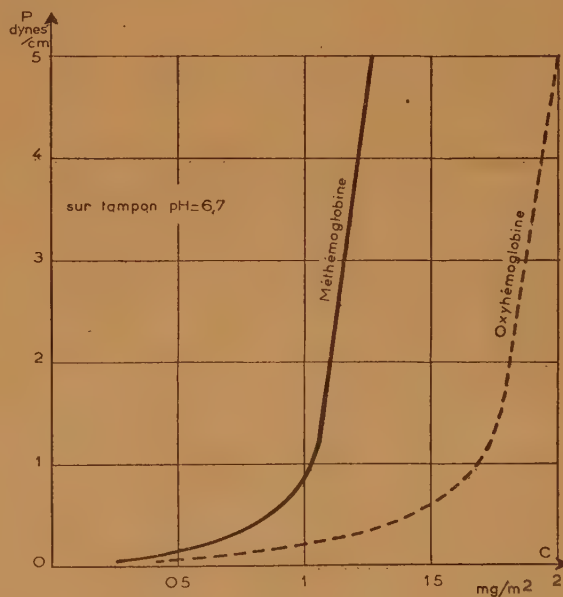


Fig. 3.

transformation sous l'action du support [en solution, en effet, la méthémoglobine a une masse moléculaire de 68 000 ⁽⁴¹⁾]. Il semble du reste qu'on puisse parfois, expérimentalement, repérer un déroulement de la

molécule en surface avec le temps. (Il pourrait aussi s'agir d'une adsorption après un étalement imparfait.)

A pH 4,5 la masse moléculaire est de l'ordre de 16 000. L'action d'un accroissement d'acidité est

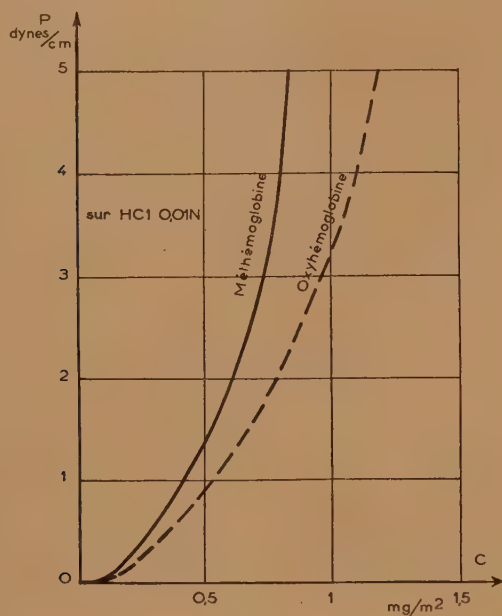


Fig. 4.

plus marquée ici que dans le cas de l'oxyhémo-globine où l'on se trouve à ce pH en présence de demi-molécules (35 000).

A pH 2 la masse moléculaire (10 000) est de même ordre de grandeur que celles de l'oxyhémo-globine et de la globine.

En conclusion, les couches superficielles d'oxyhémo-globine et de méthémoglobine n'étant pas identiques, ce n'est pas un *film de méthémoglobine* que l'on obtient lorsqu'on étale une *solution d'oxyhémo-globine*.

La molécule superficielle de méthémoglobine semble beaucoup plus fragile en surface que celle d'oxyhémo-globine; non seulement elle est plus sensible à l'action du pH ou de la nature du support, mais encore, le fait même de passer en surface semble augmenter son instabilité. Cette aptitude à se « dénaturer » se retrouve en solution où la méthémoglobine est moins stable que l'oxyhémo-globine.

CHAPITRE III

TRANSFORMATIONS DE LA MOLÉCULE PROTÉIQUE

J'ai montré qu'on peut attacher à chaque protéine, dans des conditions bien définies correspondant à

son domaine de stabilité, un certain nombre de critères fournis par l'isotherme superficielle, à savoir:

- a) forme générale de la courbe;
- b) masse moléculaire;
- c) aire de la molécule au point de collapse.

Sous l'action de nombreux agents, une protéine peut subir toutes sortes de modifications appelées souvent improprement « dénaturation » (expansion ou déformation de la molécule, modification intramoléculaire, rupture de liaisons, scission).

Les changements de forme de l'isotherme pourront servir à repérer les *transformations* subies par la molécule, soit *avant*, soit *au moment* de l'étalement.

J'ai appliqué cette méthode à l'oxyhémo-globine dans les quelques exemples indiqués ci-dessous.

1° Action sur la molécule superficielle (action du support).

La stabilité de la molécule protéique superficielle dépend non seulement du pH du support, mais aussi de sa concentration et de sa composition.

INFLUENCE DU CHLORURE DE SODIUM (30, 4).

Un support tamponné au voisinage du pH isoélectrique par des tampons phosphates M/45 et conte-

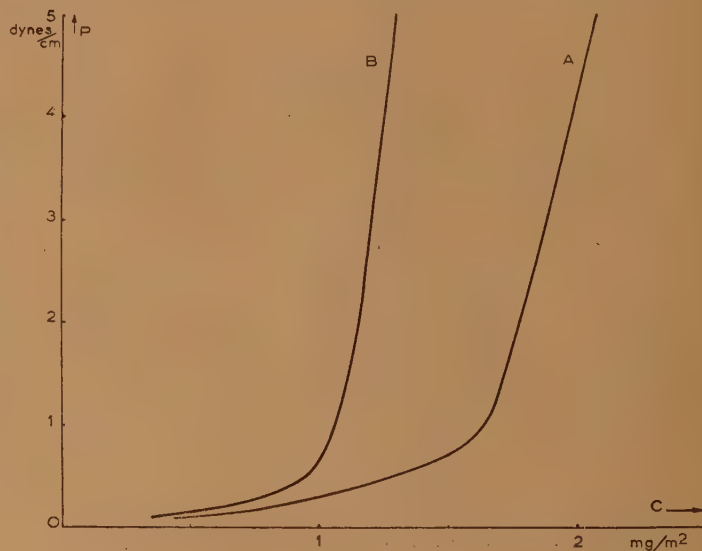


Fig. 5.

Oxyhémo-globine

- A — sur tampon phosphates M/45 pH 7
B — sur tampon phosphates M/45 + NaCl M/2 pH 7

nant 3 % de NaCl (0,5 M environ) diminue notablement, sous pression donnée, la concentration superficielle de l'oxyhémo-globine (fig. 5).

Sa masse moléculaire est alors de 35 à 40 000, soit à peu près la moitié de celle de la molécule entière (fig. 6). Des mesures faites à la pression de collapse

INFLUENCE DU SULFATE D'AMMONIUM.

BULL^(6, 7) pour déterminer les masses moléculaires de protéines ajoutait souvent dans le support du sulfate d'ammonium afin de faciliter leur étalement. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ diminuant la solubilité des protéines dans l'eau, devrait leur donner les caractères superficiels de protéines peu solubles.

Les isothermes de l'oxyhémoglobine (protéine très soluble dans l'eau étalée sur des supports contenant 5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,4 M environ), mettent en évidence la diminution de la solubilité de la protéine; la cosurface est très petite quel que soit le pH du support.

En réalité l'action de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sur l'oxyhémoglobine est beaucoup plus complexe car dès le pH isoélectrique elle s'accompagne d'une scission de la molécule en deux moitiés, tout à fait analogue à celle produite par NaCl: au voisinage du pH isoélectrique les courbes $p - C$ sont pratiquement identiques; la masse moléculaire sur le support contenant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est de 32 000; la concentration superficielle à la pression de collapse (22 dynes/cm) permet le calcul de « l'épaisseur moyenne » (14 Å) et de l'aire de la molécule superficielle (3 100 Å²)⁽⁴⁾.

La variation de la masse moléculaire en fonction du pH se trouve profondément modifiée par la présence de ce sel (fig. 7). De pH 7 à 5,4 la molécule est

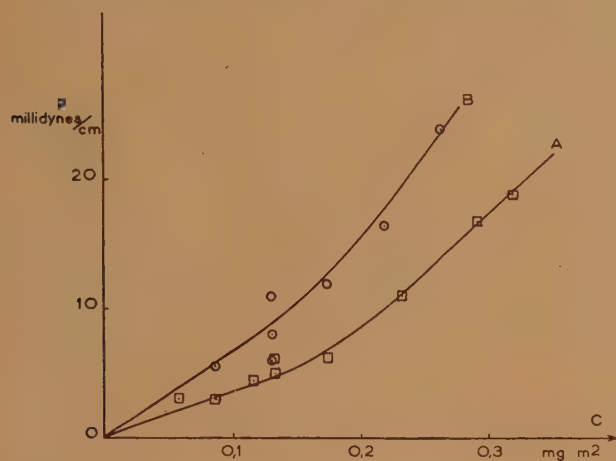


Fig. 6.

Oxyhémoglobine (vers 17° C, pH 7-7,4)

- A — (sans NaCl) $M \approx 70\,000$
- B — (avec NaCl) $M \approx 35\,000$

montrent que, comme lors de la première scission acide entre pH 5 et 4, l'aire de la molécule superficielle (3 100 Å²) est peu différente de celle de la molécule entière, mais que « l'épaisseur moyenne » (14 Å) est devenue moitié. La scission se fait donc aussi par dédoublement de deux palets. Ces résultats sont à rapprocher de ceux d'IMAHORI⁽²²⁾ (sur support KCl 0,2 M avec l'hémoglobine de cheval); celui-ci n'ayant jamais, semble-t-il, travaillé dans les conditions où en surface la molécule reste entière, les attribuait à une « dénaturation superficielle ».

Il semble que l'addition de quantités plus grandes de NaCl, (4 et 5 %, soit environ 0,7 et 0,85 M en NaCl) ne modifie pas davantage la forme de l'isotherme.

Si l'on étale sur un support de pH voisin de la neutralité de l'oxyhémoglobine dissoute dans une solution de NaCl (0,5 M), soit après quelques heures, soit après quarante huit heures, la valeur de la masse moléculaire est alors de 60 000 environ, ce qui semble indiquer une scission partielle dans la solution. L'action en surface serait donc plus profonde qu'en solution.

Ces résultats sont à rapprocher d'un fait signalé par DOGNON et GOUGEROT⁽¹³⁾: l'oxyhémoglobine pure en solution aqueuse ne mousse pas, mais elle mousse en solution salée.

GUTFREUND⁽¹⁹⁾ a signalé plus récemment la possibilité d'une scission progressive des molécules d'hémoglobine dans des solutions 1 M en NaCl.

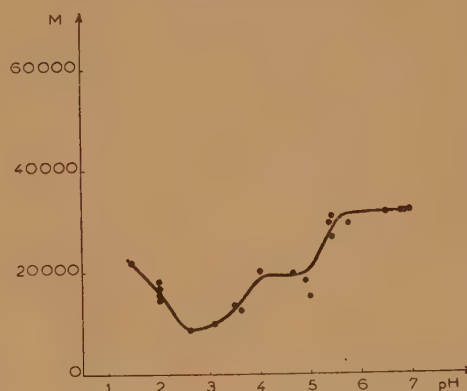


Fig. 7.

Oxyhémoglobine sur supports contenant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

scindée en deux moitiés. De pH 5 à 1,5 la masse moléculaire diminue encore mais pas de façon régulière (minimum). A pH 2 il y aurait quatre fragments au lieu des six ou huit possibles. La masse moléculaire est en effet proche de 17 000, « l'épaisseur moyenne » de 12 Å et l'aire moléculaire de 1 700 Å² (résultats à rapprocher de ceux d'IMAHORI⁽²²⁾ pour l'hémoglobine de cheval sur un support de pH 1,8 contenant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: $M = 13\,800 \pm 2\,800$; d'après lui la molécule est scindée en quatre).

Ainsi les molécules d'oxyhémoglobine sur un support contenant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tendent à se ramasser mais deviennent aussi plus fragiles.

2° Action sur la molécule native (action en solution).

ACTION DU DIOXANE (30).

Le dioxane ajouté en petite quantité à une solution d'oxyhémoglobine (1 %) y provoque des modifications (augmentation du pouvoir moussant et décoloration). Superficiellement ce phénomène se repère par un changement de l'isotherme caractéristique. On peut suivre la cinétique en portant en fonction du temps les aires sous pression donnée d'une série de films étalés, à différents instants de l'évolution de la solution, sur tampon phosphates M/45 pH 7,3.

ACTION DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE.

J'ai déjà signalé le rôle de supports plus ou moins concentrés en HCl sur la molécule superficielle d'oxyhémoglobine (*). On sait que la liaison hémoglobine est rompue en solution chlorhydrique suffisamment concentrée (1, 29, 33).

Si on laisse de l'oxyhémoglobine pendant une heure dans HCl N/200 et dans HCl N/20, seule cette dernière solution brunit, et seule, étalée, après dilution convenable dans l'eau distillée (on appellera B cette solution), sur tampon phosphates M/45 pH 7,2, elle donne par rapport à un témoin (oxyhémoglobine) une isotherme décalée vers les concentrations plus faibles (fig. 8).

Dans la solution A (oxyhémoglobine dissoute dans HCl N/200 puis diluée au moment de l'étalement dans de l'eau distillée) les molécules conservent même après quarante-huit heures de contact avec HCl une masse moléculaire entière. Or le pH d'une solution d'oxyhémoglobine (environ 4 milliatomes de fer/litre) dans HCl N/200 est compris entre 6 et 7; le pH d'une solution de même concentration en oxyhémoglobine dans HCl N/20 est de l'ordre de 3,5.

Ainsi nos résultats ne sont pas en désaccord avec ceux de GOUGEROT (46). Cet auteur a constaté d'une part qu'en solution, dès pH 3,5, la séparation des hèmes et de la globine est immédiate, et d'autre part, qu'en surface, après étalement sur support neutre d'une solution de pH 3,5, la concentration superficielle sous pression donnée se trouve être moitié de celle d'une solution d'oxyhémoglobine de pH 7.

Une première série d'expériences, faites en étalant un témoin et la solution B sur des supports HCl plus ou moins concentrés, semble indiquer qu'une action nette de l'acidité apparaît en surface pour des concen-

trations d'HCl plus faibles qu'en solution: La protéine soumise avant étalement au traitement par HCl N/20 peut encore réagir aux variations de pH du support (fig. 8). Mais la rupture de la molécule en solution

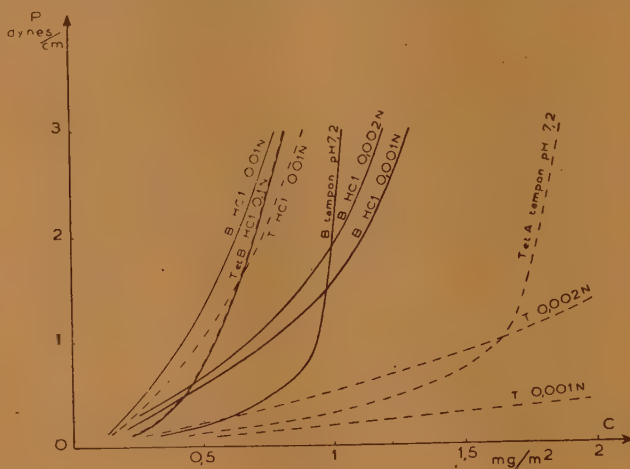


Fig. 8.

T — Oxyhémoglobine (témoin)
A — Oxyhémoglobine restée 1 heure dans HCl N/200
B — Oxyhémoglobine restée 1 heure dans HCl N/20
sur différents supports

serait irréversible car l'oxyhémoglobine, même étalée sur support neutre, garde désormais une aire caractéristique de la molécule rompue.

Les variations de l'acidité du support se font surtout sentir par des changements de forme des tronçons intermédiaires.

Enfin, signalons que les isothermes établies avec la solution restée dans HCl N/20 (solution B) étalée sur un support de pH voisin du pH isoélectrique et sur HCl 0,01 N ressemblent beaucoup à celles de méthémoglobine étalée sur les mêmes supports.

Une deuxième série d'expériences faites avec de l'oxyhémoglobine laissée plus ou moins longtemps (de quelques secondes à quarante-huit heures) en solution dans HCl N/20 vers 5° C avait été entreprise pour voir si la réaction était immédiate ou non.

1° L'aspect des courbes $p - C$, aux moyennes pressions, après étalement de ces solutions sur support tamponné vers pH 7, est caractéristique de la molécule rompue. Sous 5 dynes/cm la concentration superficielle est assez voisine de 1 mg/m².

Au micromanomètre la masse moléculaire moyenne est sensiblement moitié de celle de l'oxyhémoglobine et indépendante du temps de contact.

La méthode superficielle indiquerait ainsi que la réaction est immédiate.

2° L'examen de ces solutions (pH final 3,5 — 3,6) au spectrophotomètre de Beckman s'est avéré très complexe; le spectre de ces solutions, sensiblement

identique, indique la présence de deux corps au moins dont de la méthémoglobine dénaturée.

On voit ainsi d'après les quelques expériences décrites ici, que la technique superficielle peut parfois être utilisée pour repérer les transformations survenues dans la molécule native et en suivre l'évolution. L'étalement, sur support convenable, pourrait être comparé à un *phénomène de trempe* et permettrait de saisir les états successifs par lesquels passe la protéine en solution.

D'autre part, la molécule superficielle subit aussi des transformations, et ce sous l'influence de mêmes agents (ajoutés dans le support) que la molécule en solution. Mais elle y est généralement encore plus sensible, peut-être parce que lors de son passage en surface la molécule se trouverait plus exposée (*).

CHAPITRE IV

SUR LES CHANGEMENTS DE PROPRIÉTÉS DE LA MOLÉCULE PROTÉIQUE LORS DE L'ÉTALEMENT

La raison de la stabilité des films protéiques n'est pas encore élucidée; elle serait, d'après certains auteurs, le résultat d'une transformation de la protéine soluble en variété insoluble, comparable à la coagulation de l'ovalbumine chauffée, et souvent appelée de ce fait « *dénaturation superficielle* ». Différentes interprétations (dépliage des chaînes, ouverture de la molécule, apparition des groupes hydrophobes) ont été données pour expliquer cette transformation, peut-être irréversible, et confirmée par certains faits expérimentaux: la fibre d'ovalbumine de Devaux (obtenue par compression du film entre deux barrières) est incapable de se réétaler (¹¹); la structure de la molécule serait différente dans la protéine native et dans un film prélevé (²); certains enzymes, certaines hormones, perdent après étalement, tout au moins partiellement, leur activité biologique (^{8, 9, 25}); la solubilisation du film dans le support, même à la pression de collapse, serait impossible à constater (²⁸).

En fait, la stabilité des films protéiques n'est peut-être pas due à une « *dénaturation* » mais à la faible probabilité de désorption de la molécule en surface qui nécessiterait pour être immergée une énergie

considérable. D'ailleurs les protéines ne sont pas les seules substances solubles capables de former des films stables; c'est aussi le cas des tweens et de certains acides biliaires (³⁴). D'autre part, il existe aussi des faits en faveur d'une transformation réversible: certains enzymes gardent toute leur activité même après étalement (^{10, 15, 39}). POURADIER a constaté que des films formés à partir de fractions légères de gélatine devenaient solubles dans le support sous l'effet de la compression; MITCHELL a fait des observations assez analogues sur la gliadine (³¹). Certaines mesures de GUASTALLA (¹⁸), BULL (⁷), POURADIER (³⁵), ont montré que pour une protéine peu fragile, la masse moléculaire de la protéine étalée était la même que celle de la protéine en solution. J'ai montré ici qu'il était possible même avec une protéine fragile de retrouver, après étalement, sa masse moléculaire de protéine « *native* », et que la molécule superficielle conservait parfois, au moins partiellement, les propriétés qu'elle avait en solution.

Le passage de la molécule protéique d'un état natif à un état superficiel n'est pas en contradiction avec ces constatations qui prouveraient seulement que la transformation n'affecte pas des liaisons importantes et ne provoque pas une scission de la molécule, mais correspond plutôt à un remaniement.

Le problème qui reste posé est celui de la réversibilité de la transformation. J'ai essayé de voir:

- 1) s'il pouvait y avoir solubilisation du film protéique dans le support;
- 2) comment se présentait l'adsorption à partir de solutions protéiques.

1° Essai de solubilisation d'une couche superficielle protéique.

Au cours de certaines expériences faites avec des films de gliadine fortement comprimés (au-dessus de la pression de collapse) j'ai constaté la présence d'un film dans le compartiment B où je n'avais pas

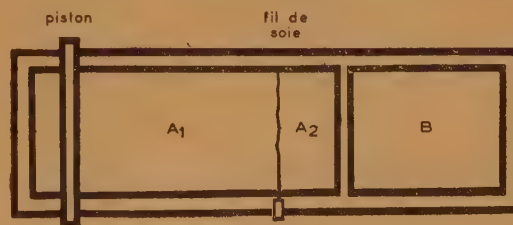


Fig. 9.

déposé de protéine. Un cadre spécial en mica paraffiné a été construit pour ces expériences afin d'éviter au maximum les possibilités de fuite et d'augmenter le taux de compression par réduction de l'espace nuisible (fig. 9). Le montage permet toujours d'étaler

(*) Des expériences actuellement en cours consistent à modifier sous un film étalé le pH du support. Il semble d'après ces expériences que ce soit au moment de l'étalement, et non après, que la molécule soit particulièrement sensible au pH du support. Sur le film déjà étalé, seul le tronçon intermédiaire serait modifié, ce qui paraît indiquer que les groupes polaires dans la molécule superficielle restent encore capables de réagir.

la protéine sur une surface libre de film (A_1); puis on soulève un fil de soie servant de barrière supplémentaire (entre A_1 et A_2) et l'on comprime en A_2 le film qu'on vient d'étaler; on laisse retomber le fil de soie, et l'on répète l'opération plusieurs fois de façon à obtenir en A_2 un film de très grande concentration superficielle. Le risque de faire passer de la protéine en solution est ainsi réduit au minimum.

La présence d'un film en B serait due à la désorption du film de A_2 , à la diffusion des molécules passées en solution, et à une réadsorption en B. (J'ai cru aussi parfois observer un film en B avec l'oxyhémoglobine.) Ce serait un argument en faveur de la réversibilité de l'éventuelle transformation en surface de la molécule native (molécule native $\rightleftharpoons$ molécule superficielle) et en accord avec certaines expériences sur les enzymes.

2° Adsorption des protéines à la surface de leurs solutions aqueuses.

Les molécules des solutions protéiques viennent s'adsorber en surface et constituer un film d'adsorption.

BULL et NEURATH⁽³²⁾ pensent que dans la plupart des cas il n'y a pas d'équilibre entre la solution protéique et le film. Néanmoins, j'ai suivi au tensiomètre de Dognon-Abribat en fonction du temps la tension superficielle de solutions protéiques (notamment d'oxyhémoglobine) à différentes concentrations afin de voir si cette adsorption atteignait un équilibre,

les mesures ont été reprises à 5° C (en effet, aux grandes dilutions (0,5 mg/l) le temps nécessaire pour atteindre une valeur à peu près stable de la tension superficielle est très long, et à la température du laboratoire les solutions risquent de s'altérer); elles ont donné des résultats du même ordre de grandeur.

On a représenté les pressions superficielles (c'est-à-dire les abaisséments de tension superficielle), mesurées lorsqu'elles paraissent avoir atteint une valeur stable (*), en fonction des logarithmes des concentrations.

Il n'y a pas lieu de faire état de la chute brusquée de la pression observée aux très grandes dilutions (0,1 — 0,2 mg/l), portion AB de la courbe. En effet il y avait alors si peu de molécules protéiques présentes qu'une adsorption monomoléculaire sur les parois du récipient pouvait suffire à épuiser presque complètement les solutions.

La portion BC est presque horizontale malgré le domaine étendu de concentrations qui lui correspond (de 0,4 mg/l à 65 mg/l).

Si l'adsorption était réversible, elle devrait être régie par la relation de Gibbs, qui s'écrit sous une forme simplifiée :

$$\delta = \frac{1}{kT} \frac{dp}{d \ln C}$$

D'après cette relation la densité superficielle δ (nombre de molécules adsorbées par cm^2) est proportionnelle à la pente de la tangente à la courbe d'adsorption représentée en coordonnées semi-logarithmiques.

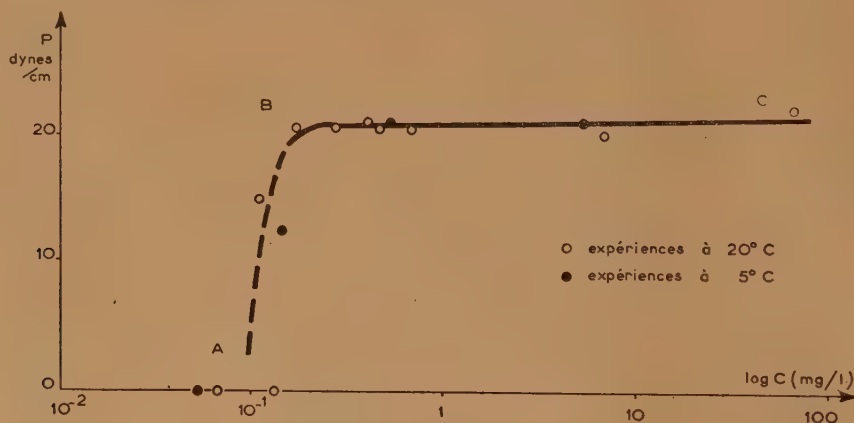


Fig. 10.

pour les solutions diluées tout au moins; avec les solutions de l'ordre de 1 g/l il y a sans doute formation de gels superficiels.

La figure 10 représente les résultats d'une série de mesures faites à 20° C avec de l'oxyhémoglobine dissoute soit dans de l'eau tridistillée, soit dans un tampon phosphates M/45 à pH 7. A titre de contrôle

Lorsqu'il s'agit de corps adsorbé à petites molécules cette pente permet de déterminer δ avec une bonne précision. Mais ici les molécules occupent beaucoup

(*) Remarquons que les pressions superficielles correspondant à un palier (de l'ordre de 20-21 dynes/cm) ne sont pas éloignées de la pression de collapse (22 dynes/cm). BULL avait déjà fait ce rapprochement dans le cas de l'ovalbumine⁽³²⁾.

de place et même si elles sont très serrées leur nombre δ par cm^2 est beaucoup plus petit que pour un corps tensioactif organique dont l'aire moléculaire est de l'ordre de 25 à 40 Å²). Si l'on prend pour l'aire de la molécule d'oxyhémoglobine $3\,000\text{ Å}^2 = 3\,000 \cdot 10^{-16}\text{ cm}^2$ on a :

$$\frac{dp}{d \ln C} = kT\delta \approx \frac{400 \cdot 10^{-16}}{3\,000 \cdot 10^{-16}} = 0,13$$

ou en passant aux logarithmes vulgaires :

$$\frac{dp}{d \log C} = 0,30.$$

Les variations de pression superficielle à attendre ne seraient donc que de 0,30 dynes/cm lorsqu'on dilue la solution 10 fois et de 0,60 dynes/cm lorsqu'on la dilue 100 fois.

Ainsi la courbe qui représenterait une *adsorption réversible* de molécules aussi grosses que celles de l'hémoglobine serait pratiquement horizontale. Les résultats que j'ai obtenus ne sont donc nullement incompatibles avec l'hypothèse d'une adsorption réversible. On ne peut affirmer qu'il s'agisse d'un équilibre, mais on ne peut pas le nier non plus.

Les essais de solubilisation d'un film protéique et les résultats sur l'adsorption ne nous permettent pas de conclure si la transformation d'une protéine en surface est réversible. Il faudrait reprendre ces expériences en utilisant comme matériel expérimental une protéine *stable* et de masse moléculaire *peu élevée* qui puisse faire simultanément l'objet de recherches de types différents et permettrait peut-être de résoudre ce problème.

CONCLUSIONS.

Au cours de cette étude on a montré que :

1° L'oxyhémoglobine en surface a une masse moléculaire voisine de celle de la protéine native, dans des conditions convenables. La molécule sous haute pression aurait une aire comparable à celle de la molécule dans le cristal (à condition de faire quelques hypothèses sur la position des molécules dans le film).

La molécule superficielle d'oxyhémoglobine reste stable (comme en solution) dans un certain intervalle de pH, en dehors duquel elle subit un certain nombre de scissions : la première, entre pH 5 et 4, correspondrait à deux moitiés de molécules, formées par dédoublement en hauteur de la molécule entière; à pH 2

et 1 les fragments seraient uniquement des fragments de globine.

Elle est, en outre, sensible à l'action de différents agents qui peuvent, même au pH isoélectrique, provoquer une scission.

Il n'y a formation directe, lorsqu'on étale de l'oxyhémoglobine sur support neutre, ni de globine ni de méthémoglobine.

2° De façon plus générale, à chaque protéine correspond une *isotherme caractéristique* dont les variations permettent de rendre compte de changements survenus dans la molécule, soit avant, soit au moment de l'étalement.

La molécule superficielle ressemble parfois par ses dimensions et son comportement à la molécule en solution, mais il semble que sous l'influence de certains agents elle puisse se rompre, au moment de l'étalement, plus facilement que la molécule en solution.

L'hypothèse concernant les rapports de la cosurface avec l'encombrement de la molécule superficielle trouverait un appui dans certains faits expérimentaux : la valeur de la cosurface paraît être très petite lorsque la molécule est très peu soluble dans le support liquide.

3° Il est encore impossible de conclure avec certitude à la réversibilité ou à l'irréversibilité de la transformation subie par la molécule protéique lors de son passage à l'état de molécule superficielle. Quoiqu'il en soit cette transformation ne serait peut-être pas aussi profonde que celle envisagée par certains auteurs (2, 33). Tout d'abord il n'est pas exclu que la molécule superficielle conserve une certaine réactivité, mais des expériences systématiques, où l'on change directement sous le film, le pH et la composition du support, restent à faire. D'après KAPLAN et FRASER (26) toutes les liaisons de la molécule n'ont pas été rompues lors de l'étalement puisque les molécules d'un film d'ovalbumine sont encore capables de se dérouler sous l'action des ultraviolets. D'autre part les expériences exposées ici ont montré que la molécule superficielle n'avait pas perdu toute ressemblance avec la molécule native. KAPLAN et FRASER (26), à la suite d'observations sur des films soit de protéine « native », soit de protéine « dénaturée » avant étalement, ont été amenés à penser que les molécules protéiques sont relativement moins déformées à une interface que celles traitées par des agents « dénaturants ».

Il sera sans doute intéressant, du fait de l'existence possible in vivo de films protéiques contrôlant aux interfaces certaines réactions physiques et chimiques (20, 40) d'étudier ultérieurement les couches superficielles protéiques, non plus comme celles envisagées ici, à une interface eau-air, cas très particulier des couches interfaciales qui ne se présente que très

rarement in vivo, mais à une interface eau-huile où les conditions se rapprocheraient déjà plus de celles de l'organisme (*).

(*) Le présent travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Physique de la Faculté des Sciences de Paris, avec l'aide matérielle du Centre National de la Recherche Scientifique.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

M. le Professeur E. BAUER qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire;

M. le Professeur R. WURMSER qui m'a permis d'utiliser les ressources de son laboratoire;

et enfin M. J. GUASTALLA, Maître de Recherches, qui m'a initiée à la Physique des surfaces, et dont les précieux conseils m'ont guidée au cours de ce travail.

Je prie tous ceux qui ont facilité ces recherches, et en particulier M^{me} H. COLSON-GUASTALLA, de trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) N. L. ANSON et A. E. MIRSKY. — *J. Gen. Physiol.*, 1930, 13, 469.
- (2) W. T. ASTBURY, F. O. BELL, E. GORTER et J. Van ORMONDT. — *Nature*, 1938, 142, 33.
- (3) G. H. BEAVEN et E. R. HOLIDAY. — *Ad. Prot. Chem.*, 1952, 7, 319.
- (4) N. BENHAMOU. — *C. R. Ac. Sc.*, 1954, 238, 1316.
- (5) R. BOURILLON. — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1952, 34, 734.
- (6) H. B. BULL. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, 67, 4.
- (7) H. B. BULL. — *J. Biol. Chem.*, 1950, 185, 27.
- (8) B. F. CHOW, H. B. Van DYKE, R. O. GREEP, A. ROTHEN et T. SHLEDOWSKY. — *J. Biol. Chem.*, 1941, 140, xxvi.
- (9) J. F. DANIELLI, M. DANIELLI et J. R. MARRACK. — *Brit. J. Exper. Path.*, 1938, 19, 393.
- (10) G. A. DEBORIN. — *Doklady Akad. Nauk., SSSR*, 1951, 77, 309.
- (11) H. DEVAUX. — *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 201, 109.
- (12) A. DOGNON et L. GOUGEROT. — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, 142, 1490.
- (13) R. M. FERRY et A. A. GREEN. — *J. Biol. Chem.*, 1929, 81, 175.
- (14) P. GEORGE et G. HANANIA. — *Biochem. J.*, 1953, 55, 236.
- (15) E. GORTER. — *Proc. Roy. Soc. A.*, 1936, 155, 706.
- (16) L. GOUGEROT. — *Thèse*, Paris, 1947.
- (17) N. GRALEN. — *Biochem. J.*, 1939, 33, 1907.
- (18) J. GUASTALLA. — *Thèse, Mem. serv. chim. de l'Etat*, 1947, 33, 265.
- (19) H. GUTFREUND. — *Haemoglobin*. London, Butterworth, 1949, p. 197.
- (20) T. HAYASHI. — *American Naturalist*, 1953, 87, 209.
- (21) A. H. HUGHES. — *Proc. Roy. Soc.*, 1936, A 155, 710.
- (22) K. IMAHORI. — *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1952, 25, 121.
- (23) J. H. P. JONXIS. — *Biochem. J.*, 1939, 33, 1743.
- (24) E. M. JOPE. — *Haemoglobin*, London, Butterworth, 1949, p. 205.
- (25) J. G. KAPLAN. — *J. Colloid Sc.*, 1952, 7, 382.
- (26) J. G. KAPLAN et M. S. FRASER. — *J. Biol. Chem.*, 1954, 210, 57.
- (27) P. KISTLER, A. BURY, H. NITSCHMANN. — *Helv. Chim. Acta*, 1953, 36, 1058.
- (28) I. LANGMUIR. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1917, 39, 1848.
- (29) U. S. LEWIS. — *J. Biol. Chem.*, 1954, 206, 109.
- (30) J. MICHEL et N. BENHAMOU. — *C. R. Ac. Sc.*, 1949, 228, 1577.
- (31) J. S. MITCHELL. — *Trans. Far. Soc.*, 1937, 33, 1429.
- (32) H. NEURATH et H. B. BULL. — *Chem. Revs.*, 1938, 23, 391.
- (33) H. NEURATH, P. GREENSTEIN, F. W. PUTNAM et G. O. ERICKSON. — *Chem. Revs.*, 1944, 34, 57.
- (34) E. OTERO AENLLE. — *Mem. des Serv. Chim. de l'Etat*, 1953, 38, 139.
- (35) J. POURADIER. — *Thèse*, Paris, 1948.
- (36) J. ROCHE, A. ROCHE, I. R. ADAIR et M. E. ADAIR. — *Biochem. J.*, 1932, 26, 1811.
- (37) J. ROCHE et R. COMBETTE. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, 19, 627.
- (38) J. ROCHE et M. S. CHOUAIECH. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1940, 22, 263.
- (39) V. S. SCHAEFER et I. LANGMUIR. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 60, 1351.
- (40) H. SOBOTKA. — *Medical Physics*, 1950, 2, 550.
- (41) T. SVEDBERG et R. FAHRAEUS. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1926, 48, 430.

DEUXIEME THESE.

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

L'acide ascorbique oxydase. Action des ions cuivriques sur l'inactivation de cet enzyme.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 24 février 1955,
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN SARRAILH.

IMPRIME PAR L'IMPRIMERIE DURAND, RUE FULBERT, CHARTRES (E.-L.) FRANCE (1956)
